Mikrobiologische Umwandlung von bicyclischen Monoterpenen mit *Absidia orchidis* (Vuill.) Hagem

---

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie,
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

BEAT V. PFRUNDER
aus Basel

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1969

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0050

Mikrobiologische Umwandlung von bicyclischen Monoterpenen mit *Absidia orchidis* (Vuill.) Hagem

---

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie,
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

BEAT V. PFRUNDER
aus Basel

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1969

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. Ch. Tamm und Dr. C. A. Grob.

Basel, den 12. Mai 1967

Prof. Dr. H. Huber
Dekan

Herrn Beat V. Pfrunder wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 12. Mai 1967 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 12. Mai 1967 genehmigten Inauguraldissertation, drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Fassung mit dem Titel:

«*Mikrobiologische Umwandlung von bicyclischen Monoterpenen mit* Absidia orchidis (Vuill.) Hagem»

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. Institut für organische Chemie der Universität Basel;
2. Universitätsbibliothek Basel;
3. Schweizerische Landesbibliothek Bern.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Separatabdruck aus Helvetica Chimica Acta,
Volumen 50, Fasciculus 6, 1969

Mikrobiologische Umlagerung von bicyclischen Monoterpenen durch *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM.

1. Teil: Reduktion von Campherchinon und Isofenchonchinon[1])

17. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

Summary. (−)-Camphorquinone (**1a**) was transformed to a mixture consisting of 3-endo-hydroxy-camphor (**2a**) (40%), 3-exo-hydroxy-camphor (**3a**) (30%) and 2-endo-hydroxy-epi-camphor (**4a**) (30%) by an aqueous suspension of the mycelium of *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. The composition of the reduction products was determined by the NMR. spectra. Incubation of the enantiomeric (+)-camphorquinone (**1b**) under the same condition yielded 3-exo-hydroxy-camphor (**3b**) as single product. Since both substrates form their products immediately and in the same ratio the possibility of a posterior isomerization of **3a** yielding the ketols **2a** and **4a** can be ruled out. For comparison the course of the chemical reduction of camphorquinone (**1**) to the ketols (Zn in acetic acid, hydrogenation with RANEY-Ni as catalyst, $NaBH_4$) was investigated. Camphor was not transformed by *Absidia orchidis*. (−)-Isofenchonequinone (**6a**) yielded upon incubation with an aqueous suspension of the mycelium of *Absidia orchidis* exclusively 2-endo-hydroxy-epi-isofenchone (**7a**). The enantiomer diketone **6b** gave the same result, *i.e.* the ketol **7b** as the only transformation product. Also with isofenchonequinone the chemical reduction to the ketols by Zn in acetic acid, hydrogenation with RANEY-Ni as catalyst and $NaBH_4$ was studied.

1. Einleitung. – Die Umwandlung von Steroiden mit Hilfe von Mikroorganismen ist in den vergangenen Jahren eingehend untersucht worden [2]. Einige dieser Reaktionen haben sogar technische Bedeutung erlangt. Demgegenüber finden sich in der Literatur nur sehr wenige Berichte über das Verhalten von Vertretern der anderen Klassen von isoprenoiden Verbindungen gegenüber mikrobiellen Enzymsystemen. In der Monoterpenreihe stammt die erste derartige Untersuchung von NEUBERG [3]. Er inkubierte (+)-Campherchinon mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und isolierte ein Gemisch von α-Ketolen, das er aber nicht weiter analysierte. 10 Jahre später berichtete eine indische Arbeitsgruppe [4] über die Umwandlung von α-Pinen durch *Aspergillus niger*. Es bildeten sich *cis*-Verbenol als Hauptprodukt, sowie Verbenon

[1]) Über einen Teil dieser Ergebnisse wurde am 151st National Meeting der American Chemical Society, Pittsburgh, Pa., USA, 22.–31. März 1966, im Rahmen des «Symposium on Novel Microbiological Transformations of Medicinal Interest» vorgetragen.

und *trans*-Sobrerol als Nebenprodukte. Es hat somit vorwiegend Hydroxylierung in Allylstellung, Dehydrierung der eingeführten HO-Gruppe und Umlagerung des C-Gerüsts stattgefunden. Die von CHAPMAN *et al.* [5] beobachtete Bildung von 1,2- und 2,3-Fencholid nach Inkubation von (+)-Fenchon mit einer *Corynebacterium*-Species dürfte auf eine BAEYER-VILLIGER-Oxydation zurückzuführen sein. Schliesslich untersuchten GUNSALUS *et al.* [6] die enzymatische Umwandlung von (+)-Campher mit Hilfe von verschiedenen Bakterienstämmen. Neben Hydroxylierungen traten Spaltungen von C–C-Bindungen und Abbau des Ringsystems ein. Die amerikanischen Autoren haben auch begonnen, die Enzyme anzureichern und zu isolieren [7].

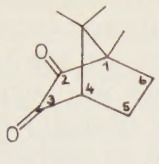
Im folgenden berichten wir über die mikrobiologische Umwandlung von einigen strukturell nahe verwandten bicyclischen Monoterpenen durch *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. A. *orchidis* wurde aus drei Gründen ausgewählt. Einmal ist das Verhalten der biogentisch eng verwandten Steroide gegenüber den Enzymen dieses Organismus eingehend untersucht worden [8]. Es war deshalb erwünscht, ihre Substratspezifität näher abzuklären. Andererseits ist es möglich, bereits mit Hilfe von wässerigen Mycelsuspensionen von *A. orchidis* rasche und gut reproduzierbare Umsetzungen zu erzielen, was die experimentelle Technik vereinfacht. Schliesslich hatten Vorversuche mit zahlreichen anderen Mikroorganismen wesentlich schlechtere Umwandlungen ergeben. Als Substrate wählten wir zunächst die α-Diketone Campherchinon und das isomere Isofenchonchinon, wobei jeweils beide Enantiomeren berücksichtigt wurden. Von beiden Verbindungen ist die absolute Konfiguration bekannt [9]. Bei der Inkubation trat im wesentlichen selektive und stereospezifische Reduktion der 1,2-Diketo-Gruppierung zum α-Ketol ein. Es schien uns deshalb interessant, das Verhalten der beiden Diketone gegenüber verschiedenen chemischen Reduktionsmitteln zu untersuchen und mit der mikrobiellen Reduktion zu vergleichen.

Alle mikrobiologischen Versuche führten wir, in Anlehnung an die Methodik von NOZAKI[2]), mit wässerigen Mycelsuspensionen von *A. orchidis* in Schüttelkulturen unter aeroben Bedingungen bei 25–28° durch, wobei eine Aktivierung der Enzyme durch geeignete Vorinkubation mit dem jeweiligen Substrat vorgenommen wurde.

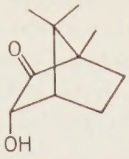
2. Campherchinon. – 2.1. *Mikrobiologische Reduktion von* (–)- *und* (+)-*Campherchinon.* (–)-Campherchinon (**1a**), das durch SeO_2-Oxydation des natürlichen (+)-Camphers leicht erhältlich ist [10], ergab nach 7 Std. Inkubation bei 28° ein kristallines Rohprodukt vom Smp. 197–206°. In den Dünnschichtchromatogrammen war auch in verschiedenen Fliessmitteln nur ein einziger Fleck sichtbar, der langsamer als das Edukt lief. Die Analysenwerte stimmten auf die Formel $C_{10}H_{16}O_2$. Im IR.-Spektrum in CCl_4 waren Hydroxylbanden bei 3600 cm^{-1} und 3480 cm^{-1} sichtbar. Eine Carbonylstreckschwingung absorbierte bei 1745 cm^{-1}. Diese Daten liessen das Vorliegen eines α-Ketols vermuten. Damit übereinstimmend liess sich das Reaktionsprodukt mit CrO_3–H_2SO_4 in Aceton [11] zu Campherchinon (**1a**) zurückoxydieren. Die NMR.-Spektren des Alkohols und seines Acetylderivates zeigten aber, dass das Kristallisat aus drei der vier theoretisch möglichen isomeren α-Ketole zusammengesetzt ist. Eine präparative Trennung der freien Ketole oder des Acetylierungsgemisches konnte weder durch Gas-Chromatographie noch durch Chromatographie an der Kieselgelsäule

[2]) Wir danken Herrn Dr. Y. NOZAKI, SHIONOGI & CO., LTD., Osaka, Japan, für die Überlassung einer Kultur von *Absidia orchidis* und die Angaben über experimentelle Einzelheiten.

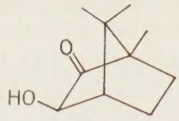
erzielt werden. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der mikrobiellen Umwandlungsprodukte liess sich jedoch aus den NMR.-Spektren ableiten.



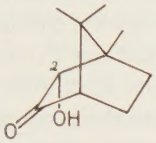
1a (–)-Campherchinon
1b (+)-Campherchinon



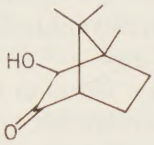
2a 3-endo-Hydroxycampher (3α-Hydroxy-1,7,7-trimethyl-nor-bornan-2-on)



3a 3-exo-Hydroxycampher (3β-Hydroxy-1,7,7-trimethyl-nor-bornan-2-on)



4a 2-endo-Hydroxy-epi-campher (2α-Hydroxy-1,7,7-trimethyl-nor-bornan-3-on)



5a 2-exo-Hydroxy-epi-campher (2β-Hydroxy-1,7,7-trimethyl-nor-bornan-3-on)

In $CDCl_3$ erschienen bei 4,22 ppm ein Dublett (J = 5,4 Hz), das dem 3-exo-Proton in **2a** zuzuordnen ist, ferner ein Singulett bei 3,75 ppm, das vom 3-endo-Proton von **3a** herrührt und ein weiteres Singulett bei 3,87 ppm, für welches das 2-exo-Proton von **4a** verantwortlich ist. Diese Zuordnungen werden weiter unten begründet. Die mikrobiologische Reduktion von (–)-Campherchinon (**1a**) hat somit die drei Ketole **2a**, **3a** und **4a** ergeben, und zwar – auf Grund der Integration der Signale – im Verhältnis von 4:3:3 (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1. *Mikrobiologische und chemische Reduktion von Campherchinon* (*1*)

Edukt und Reduktionsmittel	Prozentuale Produktverteilung			
	3-endo-Hydroxy-campher (**2**)	3-exo-Hydroxy-campher (**3**)	2-endo-Hydroxy-epi-campher (**4**)	2-exo-Hydroxy-epi-campher (**5**)
1. (–)-Campherchinon (**1a**)				
Absidia orchidis	40	30	30	0
Zn-Eisessig	40	0	60	0
H_2–Ni in Äthanol	0	100	0	0
$NaBH_4$ in Methanol	0	75	0	25
2. (+)-Campherchinon (**1b**)				
Absidia orchidis	0	100	0	0

Inkubation des enantiomeren (+)-Campherchinons (**1b**)[3] unter den gleichen Bedingungen lieferte ein Produkt vom Smp. 208–210°: $[\alpha]_D^{23} = -117° \pm 3°$ (Benzol), das

[3] Herrn Dr. R. PRAIRIE, University of Illinois, Urbana, Ill. USA., danken wir für die Überlassung eines Präparates von (+)-Campherchinon und der beiden enantiomeren 1,7,7-Trimethyl-nor-bornan-2,5-dione.

sich überraschenderweise als einheitlich erwies. Im IR.-Spektrum waren HO-Schwingungen bei 3575 cm^{-1} (scharf) und 3430 cm^{-1} (breit) sichtbar. Das Absorptionsmaximum der Carbonylgruppe lag bei 1753 cm^{-1}. Das NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ zeigte ein Singulett bei 3,75 ppm, das dem Methinproton an C-3 des 3-exo-Hydroxy-camphers (**3b**) entspricht. Der Betrag der optischen Drehung stimmt gut mit dem von 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**) überein, der durch katalytische Hydrierung von Campherchinon (**1a**) erhalten wird [12] und für den wir $[\alpha]_D^{23} = +118° \pm 3°$ (Benzol) fanden. Das unterschiedliche Verhalten der beiden optischen Antipoden bei der mikrobiellen Reduktion könnte darauf beruhen, dass die Umsetzung von Campherchinon in zwei Schritten erfolgt, nämlich zuerst Reduktion zum Ketol **3**, dann Isomerisierung von **3** zu den Ketolen **2** und **4**[4]). Die Bildung von **3a** würde rascher als diejenige des Enantiomeren **3b** erfolgen. Um dies abzuklären, verglichen wir die Bildungsgeschwindigkeiten der α-Ketole aus (+)- bzw. (−)-Campherchinon und das Produkteverhältnis in verschiedenen Zeitpunkten, indem in Parallelversuchen nach einer Inkubationszeit von 1, 3 und 7 Std. eine möglichst genaue Produktanalyse vorgenommen wurde. Sie zeigte eindeutig, dass sich bei der Reduktion von (+)-Campherchinon (**1b**) sehr rasch und ausschliesslich Ketol **3b** bildet, indem das Reaktionsgemisch nach 1 Std. ca. 28%, nach 3 Std. bereits 91% und nach 7 Std. 100% Produkt enthielt. Beim (−)-Campherchinon (**1a**) hingegen waren sofort und in gleichem Mengenverhältnis alle drei isomeren Ketole **2a**, **3a** und **4a** nachweisbar, wobei nach 1 Std. 20%, nach 3 Std. 80% und nach 7 Std. 100% des Substrats reduziert war. (+)-Campherchinon (**1b**) wird etwas rascher und selektiver als sein optischer Antipode reduziert.

Um abzuklären, ob die Unterschiede in der Reduktion der beiden Enantiomeren auf die Wirkung von verschiedenen Enzymsystemen zurückzuführen sind, haben wir vor der eigentlichen Umsetzung das reduzierende Enzymsystem von *A. orchidis* durch Vorinkubation mit den jeweiligen enantiomeren Diketonen aktiviert. Dabei wurde keine Änderung im Reduktionsverlauf festgestellt. Man kann deshalb annehmen, dass für die Reduktion der beiden enantiomeren Campherchinone dasselbe Enzym verantwortlich ist, an das sich die (+)-Form **1b** so fixieren kann, dass selektive und stereospezifische Reaktion eintritt, während dies beim enantiomeren Substrat offenbar nicht der Fall ist[5]).

2.2. *Chemische Reduktion von* (−)-*Campherchinon* (**1a**). Nachdem bei der mikrobiologischen Reduktion von (−)-Campherchinon nur drei α-Ketole entstanden waren, war es unerlässlich, alle vier theoretisch möglichen α-Ketole auf einem unabhängigen Wege herzustellen, um so in den NMR.-Spektren die Signale der Methinprotonen eindeutig zuordnen zu können. Ausserdem schien es uns, wie eingangs erwähnt, interessant, die mikrobielle Reduktion mit der chemischen und zwar unter Bedingungen, d.h. mit verschiedenen Typen von Reduktionsmitteln zu vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt. RASSAT & COULOMBEAU [13] hatten bereits die endo-

[4]) Es ist bekannt, dass sich die endo-Ketole **2** und **4** in Gegenwart von Base leichter als die Ketole mit exo-ständiger HO-Gruppe isomerisieren. In einer Lösung von 6-proz. KOH in Methanol sind bei 22° nach 24 Std. 67% endo-Ketole **2** und **4** enthalten. Unter analogen Bedingungen verändert sich das exo-Ketol **3** nicht [13].

[5]) Im Anschluss an die Versuche mit Campherchinon (**1**) inkubierten wir auch die beiden Enantiomeren des γ-Diketons 1,7,7-Trimethyl-nor-bornan-2,5-dion[3]) mit Mycelsuspensionen von *A. orchidis*. Selbst nach 24 Std. war keinerlei Umsetzung zu beobachten.

Ketole näher untersucht. Hingegen fanden wir in der Literatur keine näheren Angaben über die exo-Ketole. In diesem Zusammenhang interessierte uns auch die Geschwindigkeit der Isomerisierung der exo-Ketole zu den thermodynamisch viel stabileren endo-Ketolen.

Bei der metallischen Reduktion (Zn in Eisessig) von Campherchinon (**1**) erhielten wir, wie RASSAT & COULOMBEAU [13], die endo-Ketole **4** und **2** im Verhältnis 3:2. Im NMR.-Spektrum des Gemisches in $CDCl_3$ erschienen die folgenden zwei charakteristischen Signale für die Methinprotonen:

1. Ein Dublett bei 4,22 ppm (J = 5,4 Hz) des exo-ständigen C-3-Protons, das durch das C-4-Proton aufgespalten wird. Der Torsionswinkel zwischen den H-Atomen an C-3 und C-4 beträgt nach KARPLUS [14] ca. 40°. Eine theoretisch mögliche weitreichende Kopplung über 4σ-Bindungen mit W-Konformation [14] zwischen den Protonen an C-3 und C-5 war nicht zu beobachten.

2. Ein verbreitertes Singulett bei 3,87 ppm ($J \simeq$ 0,8 Hz) des exo-ständigen Protons an C-2. Es sind zwei weitreichende Kopplungen möglich, nämlich mit den Protonen an C-2 und C-6. Die Kopplungen dürften rund ein Hz betragen, was die Verbreiterung des Signales erklärt.

Aus der Integration der Signale bei 4,22 ppm und 3,87 ppm ergab sich die prozentuale Verteilung der beiden Isomeren.

Bei der katalytischen Hydrierung von (–)-Campherchinon mit RANEY-Ni in Äthanol erhielten wir ausschliesslich 3-exo-Hydroxy-campher (**3**). Er wurde durch das Acetyl-Derivat charakterisiert und seine Konstitution durch optische Rotationsdispersion und Circulardichroismus gesichert[6]). Die Weiterreduktion zum Diol konnte durch Verwendung von nur schwach aktivem RANEY-Ni verhindert werden. Das NMR.-Spektrum von **3** in $CDCl_3$ zeigte nur ein einziges Signal eines Methinprotons bei 3,75 ppm.

Bei der Reduktion von Campherchinon (**1**) mit $NaBH_4$ in Methanol bei –65° entstanden neben wenig endo-*cis*-Diol (5%), dessen Konfiguration auf Grund der von ANET [15] veröffentlichten Spektren für 2,3-Bornandiole bestimmt wurde, ausschliesslich die exo-Ketole **3** und **5**. Im NMR.-Spektrum in Deuterochloroform erschienen die Signale der Methinprotonen bei 3,75 und 3,55 ppm. Das Singulett bei 3,75 ppm ist dem endo-ständigen C-3-Proton zuzuordnen. Die Kopplung mit dem C-4-Proton ist nur sehr schwach, da der Torsionswinkel zwischen den Protonen an C-3 und C-4 79° beträgt [15], was einer Kopplungskonstante von 0,5 Hz entsprechen würde [14]. Das Singulett bei 3,55 ppm entspricht dem endo-ständigen Methinproton an C-2, das mit keinem anderen Proton koppeln kann.

Aus der Integration der Signale bei 3,75 ppm und 3,55 ppm folgt, dass das Reduktionsgemisch aus 75% 3-exo-Hydroxy-campher (**3**) und 25% 2-exo-Hydroxy-epicampher (**5**) besteht. Behandlung dieses Isomerengemisches mit 6-proz. KOH in Methanol bei 22° ergab nach 48 Std. ein Gemisch das aus 39% endo-Ketol **2**, 9% endo-Ketol **4**, 48% exo-Ketol **3** und 4% exo-Ketol **5** bestand. Nach 48 Std. ist das Gemisch der beiden exo-Isomeren erst etwa zur Hälfte in die endo-Isomeren übergegangen, ob-

[6]) Wir danken Herrn Prof. A. RASSAT, CENTRE DES ETUDES NUCLÉAIRES, Grenoble, bestens für die Aufnahme und Interpretation der ORD.- und CD.-Kurven.

wohl das thermodynamische Gleichgewicht ganz auf der Seite der endo-Isomeren liegt [13].

3-exo-Hydroxy-campher (**3**) liess sich unter analogen Bedingungen nicht isomerisieren. Aus diesen Versuchen folgt, dass die exo-Ketole **5** und **7** thermodynamisch stabiler sind als die endo-Ketole **2** und **4**.

Was die Signale der Methinprotonen in den NMR.-Spektren der vier isomeren Ketole betrifft, so lassen sich jetzt für Messungen in $CDCl_3$ eindeutig die folgenden Zuordnungen treffen[7]):

3-exo-H in **2**	3-endo-H in **3**	2-exo-H in **4**	2-endo-H in **5**
4,22 ppm *d* (5,4)	3,75 *s*	3,87 *s*[8])	3,55 *s*

Überblickt man die Ergebnisse der Reduktionsversuche, so wird deutlich, dass die sterisch weniger gehinderte 3-Oxo-Gruppe bevorzugt reduziert wird, wobei – mit Ausnahme der metallischen Reduktion – hauptsächlich eine exo-ständige HO-Gruppe entsteht, d.h. der Angriff des Reduktionsmittels erfolgt lediglich von der offeneren endo-Seite her. Am selektivsten verläuft die katalytische Hydrierung. Eine 2-endo-HO-Gruppe wird lediglich durch die Reduktion mit Zn erzeugt.

3. Isofenchonchinon. – 3.1. *Mikrobiologische Reduktion von (−)- und (+)-Isofenchonchinon.* Nach 8-stündiger Inkubation von (−)-Isofenchonchinon (**6a**), das durch SeO_2-Oxydation von (−)-Isofenchon erhältlich ist [16], mit einer wässerigen Mycelsuspension von *A. orchidis* bei 28°, zeigte das Rohprodukt im Dünnschichtchromatogramm einen einzigen langsamer laufenden Fleck. Nach Chromatographie an Kiesegel wurde das entsprechende Umsetzungsprodukt in reinen Nadeln vom Smp. 61,5l-62° und $[\alpha]_D^{23} = 98° \pm 3°$ (Chloroform) erhalten. Das NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ zeigt bei 3,55 ppm ein Triplett, das dem Methinproton an C-2 zuzuordnen ist. Die Aufspaltung dieses Signals kommt durch die weitreichenden Kopplungen zwischen den Protonen C-2 und C-4 und C-2 und C-6 (exo) zustande ($J = 1{,}5$ Hz).

Diese Daten liessen das Vorliegen von 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7a**) vermuten. Ein direkter Vergleich mit einem durch metallische Reduktion erhaltenen Präparat bestätigte die Identität. CrO_3-Oxydation lieferte Isofenchonchinon zurück. Auch die Acetylderivate waren identisch.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden enantiomeren Campherchinone bei der mikrobiologischen Reduktion veranlasste uns auch hier, das Verhalten des optischen Antipoden zu untersuchen. Nach Inkubation von (+)-Isofenchonchinon (**6b**) erhielten wir nur ein einziges Produkt, nämlich **7b**, d.h. das Enantiomere von **7a**.

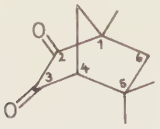
Demnach bieten die beiden enantiomeren Substrate dem Enzymsystem von *A. orchidis* gleiche Fixierungsmöglichkeiten.

3.2. *Chemische Reduktion von (−)-Isofenchonchinon.* Ebenso wie RASSAT & COULOMBEAU [13] erhielten wir bei der Reduktion von (−)-Isofenchonchinon (**6a**) mit Zn-Eisessig ein Gemisch der beiden endo-Ketole **7a** und **9a** im Verhältnis von 2:1. Ther-

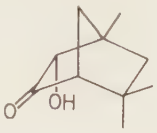
[7]) Es bedeuten: *s* = Singulett; *d* = Dublett; Zahl in Klammer ist die Kopplungskonstante *J* in Hz.

[8]) Verbreitertes Singulett mit $J \simeq 0{,}8$ Hz.

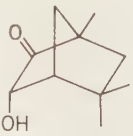
modynamisch ist **7** viel stabiler als **9**. Nach 10-stündiger Behandlung des Reaktionsgemisches mit 6-proz. methanolischer KOH liess sich reines **7** isolieren, das zur Identi-



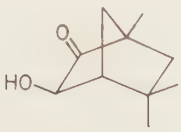
6a (−)-Isofenchonchinon
6b (+)-Isofenchonchinon



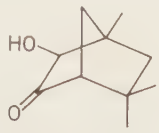
7a 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (2α-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-3-on)



8a 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon (2β-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-norbornan-3-on)



9a 3-endo-Hydroxy-isofenchon (3α-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on)



10 3-exo-Hydroxy-isofenchon (3β-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on)

fizierung des mikrobiologischen Reduktionsprodukts diente. Im NMR.-Spektrum erscheint das Methinproton von C-2 des Ketols **7** als Triplett, da es zwei weitreichende Kopplungen eingeht, nämlich mit den Protonen an C-4 und C-6 ($J = 1{,}5$ Hz). Das Methinproton an C-3 des Ketols **9** verursacht ein Dublett, da es durch das Proton an C-4 aufgespalten wird. Die Kopplungskonstante von 5,4 Hz entspricht gut dem am Modell gemessenen Torsionswinkel von rund 40°.

Nach Behandlung von (−)-Isofenchonchinon (**6a**) mit $NaBH_4$ in Methanol bei −65° erhielten wir ein Gemisch von 85% Ketol **7a** und 15% Ketol **8a**. In den Dünnschichtchromatogrammen war allerdings auch mit verschiedenen Fliessmittelgemischen nur ein einziger Fleck sichtbar. Das Reaktionsgemisch war weder durch Gaschromatographie noch durch Chromatographie an Kieselgel in die zwei Komponenten zu zerlegen. Der Nachweis von zwei isomeren Verbindungen im Reaktionsgemisch konnte aber eindeutig durch die NMR.-Spektren erbracht werden. Es waren zwei Signale von Methinprotonen sichtbar, nämlich ein Triplett bei 3,55 ppm, das dem Proton an C-2 von **7a** zugeordnet werden kann, und ein Singulett bei 3,79 ppm. Dieses Singulett wird sicher vom Proton eines Isomeren mit exo-ständiger HO-Gruppe hervorgerufen, wobei diese sowohl an C-2 wie auch an C-3 haften kann. Eine weitreichende Kopplung wäre in beiden Fällen möglich, wurde aber im 60-MHz-Spektrum nicht beobachtet. Eine sichtbare Kopplung zwischen dem endo-ständigen Proton an C-3 und dem Proton an C-4 ist kaum zu erwarten, da der Torsionswinkel zwischen diesen Protonen rund 80° beträgt, was einer Kopplungskonstante von weniger als 0,5 Hz entspricht. Aus räumlichen Gründen, d.h. wegen der Anwesenheit der geminalen 5-Methylgruppen ist ein Angriff des $NaBH_4$-Komplexes von «unten», der zu einer exo-ständigen Hydroxylgruppe führen würde, sehr unwahrscheinlich. An C-2 ist ein Angriff von unten eher möglich, da die Methylgruppe an C-1 ein viel kleineres Hindernis

darstellt. Aus diesen Gründen dürfte dem zweiten Reduktionsprodukt am ehesten die Konstitution des 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchons (**8a**) zukommen.

Bei der katalytischen Hydrierung von (–)-Isofenchonchinon (**6a**) mit RANEY-Ni in Äthanol erhielten wir neben wenig Diol (weniger als 5%) drei isomere α-Ketole. Das Diol konnte durch Chromatographie an Kieselgel vom Ketolgemisch glatt abgetrennt werden. Die Konfiguration der beiden Hydroxylgruppen konnte wegen der geringen Menge nicht abgeklärt werden. Nach dem NMR.-Spektrum enthielt das Gemisch der Monohydroxy-Verbindungen 30% **7a** (Triplett bei 3,55 ppm), 10% **9a** (Dublett bei 4,15 ppm) und 60% **8a** (Singulett bei 3,79 ppm). Die Ergebnisse der Reduktionsversuche sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. *Mikrobiologische und chemische Reduktion von Isofenchonchinon* (**6**)

Edukt und Reduktionsmittel	Prozentuale Produktverteilung			
	2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7**)	2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon (**8**)	3-endo-Hydroxy-isofenchon (**9**)	3-exo-Hydroxy-isofenchon (**10**)
1. (–)-Isofenchonchinon (**6a**)				
A. orchidis	100	0	0	0
Zn-Eisessig	65	0	35	0
H_2–Ni in Äthanol	30	60	10	0
$NaBH_4$ in Methanol	85	15	0	0
2. (+)-Isofenchonchinon (**6b**)				
A. orchidis	100	0	0	0

Es ist bemerkenswert, dass bei allen Reduktionsversuchen aus Isofenchonchinon nur ein einziger Alkohol mit exo-ständiger Hydroxylgruppe entstanden ist, wobei es sich höchstwahrscheinlich um das 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon (**8**) handelt. Die Bildung von 3-exo-Hydroxy-isofenchon (**10**) wurde nicht beobachtet.

Die Bildung eines exo-Alkohols setzt einen Angriff des Reduktionsmittels von der endo-Seite her voraus. Diese ist aber nur für die Reduktion der Carbonylfunktion an C-2 sterisch nicht gehindert. Ein Angriff an C-3 wird durch die geminalen Methylgruppen an C-5 stark erschwert. Demgegenüber ist die exo-Seite für einen Angriff vom Reduktionsreagens frei. Infolgedessen werden die beiden endo-Alkohole gebildet.

Wir danken dem «SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG» für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (Projekte Nr. 2535 und 3976).

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze ca. ± 2°. Substanzproben zur Messung der spez. Drehungen und Spektren wurden 20 Min. bei 35°/15 Torr und zur Elementaranalyse 1 Std. bei 25°/0,02 Torr getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (E. THOMMEN). Die IR.-Spektren wurden entweder mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, oder mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell IR8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, im Spektrallaboratorium des Instituts (K. AEGERTER) aufgenommen. Zur Säulenchromatographie nach DUNCAN [17] dienten Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) [18] wurde Kieselgel G als Adsorbens verwendet. Als Fliessmittel dienten meistens Äther-Petroläther-Gemische. Die Flecke wurden durch

Besprühen mit H_2SO_4 in Äthanol und anschliessendem Erwärmen auf 110° oder durch J_2-Dämpfe sichtbar gemacht.

2. *Kultur der Mikroorganismen.* Proben einer Schrägagarkultur von *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM (Herkunft: Dr. Y. NOZAKI, SHIONOGI & Co., LTD., Osaka, Japan) wurden direkt als Impfmaterial für die Nährlösung verwendet. Nährlösung: 3,5% Glucose, 2,0% Bacto-Pepton, 0,5% Maislauge. Zum Versuch wurden 1000-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml Nährlösung benutzt. Die Gefässe wurden 40 Min. im Dampfautoklaven bei 120° sterilisiert und dann beimpft. Die ERLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) 48 Std. bei 27° inkubiert. Nach Zugabe des Substrats (50–90 mg pro ERLENMEYER-Kolben) wurde während 72–120 Std. weitergeschüttelt. Bei der Umsetzung in Mycelsuspension wurde das Mycel zuerst mit dem umzusetzenden Substrat aktiviert (25 mg Substrat in 0,5 ml Aceton pro ERLENMEYER-Kolben). Nach weiterem Schütteln während 12 Std. wurde das Mycel durch Filtration auf einem Gazestoff gesammelt, leicht ausgepresst, mit dest. Wasser gewaschen und wiederum auf die ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml dest. Wasser verteilt. Zu dieser Mycelsuspension wurde das Substrat, gelöst in wenig Methanol oder Aceton, zugegeben.

3. *Campherchinon* (**1**) *aus Campher.* (Abgeänderte Vorschrift von EVANS *et al.* [10].) Eine Lösung von 16 g (+)-Campher und 20 g SeO_2 in 16 ml Essigsäureanhydrid wurde 4 Std. unter Rückfluss gekocht. Die abgekühlte Lösung wurde abfiltriert, der Rückstand mit Eisessig nachgewaschen und das Filtrat mit KOH neutralisiert. Dabei fiel Campherchinon in kleinen, unreinen Kristallen aus, die mit Wasserdampf destilliert wurden. Beim Abkühlen des Destillates kristallisierte die Hauptmenge des Produkts in langen, gelben Nadeln aus. Der im Wasser verbleibende Rest wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, die Auszüge mit Na_2SO_4 getrocknet und unter Verwendung einer VIGREUX-Kolonne eingedampft. Es resultierte 11,5 g reines krist. Campherchinon (**1**). Für mikrobiologische Umsetzungen wurden die Kristalle nochmals an der 200-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Petroläther-Äther-(3:7). Das so erhaltene Produkt kristallisierte aus Pentan in Nadeln vom Smp. 198–199° und erwies sich auch im Gaschromatogramm als einheitlich. $[\alpha]_D^{23} = -122° \pm 3°$ (c = 1,825 in Benzol).

Campherchinon wurde auch über den Isonitrosocampher auf zwei in der Literatur beschriebenen Wegen hergestellt [19]. Die Ausbeuten lagen aber in beiden Fällen unter 30%.

4. *Mikrobiologische Reduktion von (−)- und (+)-Campherchinon*

4.1. *Umsetzung von (−)-Campherchinon* (***1a***) *mit* A. orchidis. Eine Lösung von 1,5 g (−)-Campherchinon vom Smp. 198–199° in 15 ml Aceton wurde auf 15 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das aktivierte Pilzmycel in je 200 ml Wasser suspendiert war. Die Kolben wurden 7 Std. bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) wurde die wässerige Lösung viermal mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne wurden 1,48 g Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) neben 2 schwachen, langsamer laufenden Flecken (Rf-Werte 0,3) einen starken Fleck des α-Ketol-Gemisches zeigte. Das Rohprodukt wurde an 170 g Kieselgel chromatographiert. (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(3:1).) Nach Umkristallisation aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) resultierte 1,28 g Ketolgemisch **2a**+**3a**+**4a** vom Smp. 197 bis 206°. $C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,59% Gef. C 71,40 H 9,63%

4.2. *CrO_3-Oxydation des Ketolgemisches* ***2a***+***3a***+***4a***. Eine Lösung von 200 mg Ketolgemisch in 30 ml Aceton wurde unter Rühren bei 0° bis +2° innerhalb 5 Min. mit 0,9 ml einer Lösung von 3,32 g CrO_3 + 2,87 g H_2SO_4 in 50 ml H_2O [11] versetzt und weitergerührt. Nach Versetzen mit Eis, Extraktion mit Methylenchlorid, Waschen mit 2N H_2SO_4, 1N $NaHCO_3$ und Wasser, und Trocknen mit Na_2SO_4 wurden 174 mg gelbes Rohprodukt erhalten, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) gereinigt wurde. Nach Umkristallisation aus Pentan resultierten 153 mg gelbe Kristalle vom Smp. 198–199°, $[\alpha]_D^{32} = -108° \pm 3°$ (c = 1,021 in Benzol). Nach Misch-Smp., IR.-Spektrum und DC. mit (−)-Campherchinon (**1a**) identisch.

4.3. *Acetylierung des Ketolgemisches* ***2a***+***3a***+***4a***. 80 mg Ketolgemisch wurden mit 1,5 ml abs. Pyridin und 1,35 ml Acetanhydrid 36 Std. bei 38° stehengelassen, dann mit Eis versetzt, mit HCl kongosauer gestellt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Es resultierten

82 mg öliges Rohprodukt, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Lösungsmittel gereinigt wurde. Es resultierten 64 mg Öl, das sich sowohl auf Dünnschichtplatten als auch bei gaschromatographischen Untersuchungen einheitlich verhielt. Signale im NMR.-Spektrum: 5,22 ppm Dublett; 4,9 ppm breites Singulett; 4,8 ppm scharfes Singulett; 2,2–2,0 ppm (3 CH_3CO); 1,1–0,9 ppm neun Protonen (3 CH_3). Das Acetat-Gemisch konnte weder gas-chromatographisch noch säulenchromatographisch aufgetrennt werden.

4.4. *Umsetzung von (+)-Campherchinon (**1b**) mit* A. orchidis. Eine Lösung von 600 mg (+)-Campherchinon vom Smp. 198–199° in 6 ml Aceton wurde auf 6 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben gleichmässig verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 200 ml Wasser verteilt war. Hierauf wurde wie bei 4.1. beschrieben verfahren. Es resultierten 585 mg Rohprodukt, das nach Reinigen an 80 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsgemisch 540 mg 3-exo-Hydroxy-campher **3b** in farblosen Kristallen vom Smp. 208–210° ergab. $[\alpha]_D^{23} = -117° \pm 3°$ (c = 6,421 in Benzol). IR.-Spektrum in CCl_4: Banden bei 3575 cm^{-1} (OH frei), 3430 cm^{-1} (OH assoz.) und 1755 cm^{-1} (C=O-Streckschwingung).

4.5. *Vergleich der Bildungsgeschwindigkeit der Ketole aus (+)- bzw. (−)-Campherchinon.* Mit einer vereinigten Sporensuspension von zwei Schrägagarkulturen wurden total 8 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml steriler Nährlösung angeimpft und 48 Std. bei 27° auf der rotierenden Schüttelmaschine belassen. Nach 12-stündiger Aktivierung mit je 25 mg **1a** bzw. **1b** wurde das Mycel gewaschen, im Turmix zerkleinert, gleichmässig auf drei ERLENMEYER-Kolben verteilt und mit je 60 mg **1a** bzw. **1b** inkubiert. Nach 1, 3 und 7 Std. wurde, wie bei 4.1. beschrieben, aufgearbeitet, das Rohprodukt an 12 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsmittel in eine Ketol- und Campherchinon-Fraktion zerlegt und die Ketol-Fraktion mit Hilfe des NMR.-Spektrums analysiert. Resultate vgl. Theoret. Teil.

4.6. *Reduktion von (+)- und (−)-Campherchinon nach vorheriger Aktivierung des Enzymsystems von* A. orchidis *durch den entsprechenden optischen Antipoden.* Je 3 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben, die Mycel von 48-stündigem Wachstum enthielten, wurden mit je 35 mg **1a** bzw. **1b** aktiviert. Nach 12 Std. wurde das Mycel 3mal mit dest. Wasser ausgewaschen und wiederum auf die ERLENMEYER-Kolben mit 200 ml dest. Wasser verteilt. Diese aktivierte Mycelsuspension wurde dann als Substrat (pro ERLENMEYER-Kolben) mit 60 mg des optischen Antipoden (**1a** bzw. **1b**) versetzt und während 7 Std. geschüttelt. Die zwei Ansätze wurden nach 4.1. aufgearbeitet und das Rohprodukt mit Hilfe des NMR.-Spektrums analysiert.

5. *Chemische Reduktion von (−)-Campherchinon (**1a**)*

5.1. *Mit Zn in Eisessig (vgl. [9b], [19a]).* Eine Lösung von 400 mg Campherchinon vom Smp. 198–199° in 20 ml Eisessig wurde nach Zugabe von 3 ml Wasser auf 0° gekühlt und unter Rühren mit 200 mg Zn-Staub versetzt. Die anfänglich gelbe Lösung entfärbte sich im Laufe von 1,5 Std. Nach Filtrieren wurde mit KOH neutralisiert und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach 3-maligem Waschen mit Wasser wurde mit wenig Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Der Eindampfrückstand ergab aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) 362 mg farblose Kristalle vom Smp. 195–197°. Im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Äther-Petroläther-(4:1) und Methylenchlorid-Methanol-(98:2)) war das Produkt einheitlich. Auch gas-chromatographisch liess sich keine Trennung erzielen trotz Verwendung von verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon, Marlophen). Nach den NMR.-Spektren liegt ein Gemisch von 40% 3-endo-Hydroxy-campher (**2a**) und 60% 2-endo-Hydroxy-epi-campher (**4a**) vor.

5.2. *Katalytisch mit* RANEY-*Ni (vgl. [12a]).* Eine Lösung von 350 mg (−)-Campherchinon in 25 ml abs. Äthanol wurde zu 200 mg vorhydriertem RANEY-Nickel gegeben und bei Normaldruck hydriert. Nach 1 Std. war die anfänglich gelbe Lösung farblos und die für die Reduktion einer Ketogruppe benötigte Menge Wasserstoff verbraucht. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurden zur Bildung eines azeotropen Gemisches 100 ml Methylenchlorid zugegeben und das Lösungsmittel über eine VIGREUX-Kolonne abdestilliert. Aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) wurden 287 mg 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**) in reinen, farblosen Kristallen vom Smp. 208–210° erhalten; $[\alpha]_D^{23} = +118° \pm 3°$ (c = 1,324 in Benzol). RUPE *et al.* [12a] fanden den Smp. 209–211°; $[\alpha]_D = +115{,}6°$ (10-proz. Äthanol).

5.3. *Mit $NaBH_4$.* Eine Lösung von 105 mg (−)-Campherchinon vom Smp. 198–199° in 25 ml Methanol wurde auf −65° abgekühlt und mit einer Lösung von 10 mg $NaBH_4$ (1,5-fache Menge für

die Reduktion einer Ketogruppe) in 1,5 ml Methanol versetzt. Nach Reduktion und damit nach Entfärbung der anfänglich gelben Lösung (nach 5–6 Min.) wurde sofort mit 2N H_2SO_4 kongosauer gestellt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Waschen mit 2N Na_2CO_3, Wasser und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne ergab 93 mg Rohprodukt. Nach Chromatographie an 12 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsmittel resultierten aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) 86 mg farblose Kristalle vom Smp. 203–207°. Nach dem NMR.-Spektrum liegt ein Gemisch von 75% 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**) und 25% 2-exo-Hydroxy-epi-campher (**5a**) vor. – Zur Isomerisierung wurde eine Lösung von 40 mg des Ketolgemisches in 25 ml 6-proz. methanolischer KOH und 2,5 ml Wasser 48 Std. bei 23° gerührt. Nach Extraktion mit Methylenchlorid und Waschen der Auszüge mit Wasser wurden die Extrakte über Na_2SO_4 getrocknet. Es resultierten 36 mg Isomerengemisch, nach dem NMR.-Spektrum bestehend aus 39% 3-endo-Hydroxy-campher (**2a**), 48% 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**), 9% 2-endo-Hydroxy-epi-campher (**4a**) und 4% 2-exo-Hydroxy-epi-campher (**5a**).

5.4. *3-exo-Acetoxy-campher aus 3-exo-Hydroxy-campher* (***3a***). Eine Lösung von 85 mg **3a** in 1,5 ml abs. Pyridin wurde mit 1,35 ml Acetanhydrid versetzt und bei 36° stehengelassen. Nach 36 Std. wurde mit Eis versetzt und mit HCl kongosauer gestellt. Nach 4-maligem Ausschütteln mit Methylenchlorid, 3-maligem Waschen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne resultierten 82 mg öliges Rohprodukt, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel, gereinigt wurde. Es wurden 66 mg Öl, das nach längerem Stehen bei −8° Kristalle vom Smp. 42–43° bildete, erhalten. $[\alpha]_D^{23} = +109° \pm 3°$ ($c = 6{,}542$ in Chloroform).

6. (−)-*Isofenchon aus* (+)-*Fenchon*. Die Herstellung erfolgte nach Lit.-Angaben, wobei Modifikationen vorgenommen wurden. Eine Lösung von 200 g (+)-Fenchon (Präparat der FLUKA AG., Buchs SG) reiner als 98% in 800 g Äthanol wurde mit 160 g Hydroxylaminhydrochlorid in 160 ml Wasser, dann mit 200 ml 50-proz. KOH versetzt. Der Niederschlag von KCl wurde abgenutscht und das Filtrat 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Beim Stehen über Nacht kristallisierten 167 g (+)-Fenchoxim [20] in langen Nadeln vom Smp. 166–167° (sublimiert ab 130°) aus. Durch nochmaliges Kochen der verbliebenen Lösung unter Rückfluss während 14 Std. wurden weitere 45 g krist. (+)-*Fenchoxim* erhalten. (Ausbeute: 98% der Theorie.) Eine Lösung von 167 g (+)-Fenchoxim in 1,2 l abs. Äthanol wurden mit 55 g RANEY-Nickel bei 55° und 180 Atm. 24 Std. hydriert. Nach Filtrieren des Katalysators und Abdampfen über eine VIGREUX-Kolonne wurde der Rückstand (155 g) im Vakuum (15 Torr) fraktioniert destilliert. 1. Fraktion, Sdp. 32–36°: 5,5 g (verworfen); 2. Fraktion, Sdp. 76–78°: 105,0 g (70% d. Th.) Fenchylamin [21]. Nach HÜCKEL *et al.* [22] liegt ein Gemisch von α- und β-Fenchylamin vor. Destillationsrückstand: 38,0 g (verworfen). – Zu einer Lösung von 88 g Eisessig und 50 g $NaNO_2$ in 330 ml Wasser wurden im Laufe von 30 Min. 105 g (0,7 Mol) Fenchylamin (Sdp. 76–78°/15 Torr) zugetropft. Es wurde mit Wasserdampf abgeblasen, das Destillat in 4N KOH 1 Std. unter starkem Rühren auf 65° erwärmt und nochmals mit Wasserdampf destilliert. Die abgeschiedene ölige Phase wurde bei 15 Torr destilliert: 1. Fraktion, Sdp. 47–60°: 38,0 g; im IR.-Spektrum starke Vinylidenbande bei 1660 cm^{-1}; 2. Fraktion, Sdp. 60–80°: 2,5 g; im IR.-Spektrum starke Vinylidenbande bei 1660 cm^{-1}; 3. Fraktion, Sdp. 85–94°: 13,2 g; im IR.-Spektrum schwache Vinylidenbande bei 1660 cm^{-1}; 4. Fraktion, Sdp. 94–98°: 3,5 g; verworfen; 5. Fraktion, Sdp. 98–108°: 16,5 g; verworfen; Rückstand: 8,1 g; verworfen.

Für die weiteren Reaktionen wurde das α-Fenchon [23] der Fraktionen 1 und 2 verwendet.

Bei der Herstellung von α-Fenchen über das Fenchylchlorid nach RUZICKA & LIEBL [24] war die Ausbeute an α-Fenchen viel schlechter.

Eine Lösung von 40,5 g α-Fenchen in 180 g Eisessig wurde mit 20 g 50-proz. Schwefelsäure 18 Std. bei 50° gerührt. Hierauf wurde die rotbraune Lösung mit Wasserdampf destilliert und das abgeschiedene Öl in 20-proz. methanolischer KOH am Rückfluss hydrolysiert. Das durch Wasserdampfdestillation abgeschiedene farblose Öl wurde im Vakuum fraktioniert destilliert. Die Fraktion vom Sdp. 88–90° enthielt Isofenchylalkohol, der mit ca. 20% Fenchylalkohol verunreinigt war. Durch Kristallisation aus Pentan wurde 8,1 g reiner *Isofenchylalkohol* [23] vom Smp. 61–62° $[\alpha]_D^{23} = -25° \pm 3°$ ($c = 2{,}813$ in Äthanol) erhalten. Die Mutterlaugenrückstände (9,2 g) wurden in Portionen von ca. 3 g an 250 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsmittel gereinigt und lieferten weitere 5,1 g reinen Isofenchylalkohol. Die Rf-Werte der beiden Alkohole im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) betragen für Fenchylalkohol 0,8, für Isofenchylalkohol 0,7.

In eine Lösung von 2,34 g (–)-Isofenchylalkohol vom Smp. 61–62° in 180 ml Aceton wurde unter Rühren 8 ml einer Lösung von 3,32 g CrO_3, 2,87 ml H_2SO_4 in 50 ml Wasser nach [11] bei 0° zugetropft. Nach 15 Min. wurde mit Eis und Wasser versetzt, mit total 400 ml Methylenchlorid extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Erhalten wurden 2,29 g Rohprodukt, das an 220 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(7:3) gereinigt wurde. Es resultierten 2,12 g reines (–)-*Isofenchon* [23], $[\alpha]_D^{23} = -10° \pm 3°$ ($c = 7{,}20$ in Chloroform). – Grössere Mengen unreinen Isofenchons werden mit Vorteil wie folgt gereinigt (vgl. [25]): Eine Lösung von 10 g Gemisch in 50 ml Äthanol wurde mit 10 g Semicarbazidhydrochlorid und 10 g Natriumacetat in 50 ml Wasser versetzt und 4 Std. gerührt. Es resultierten 5,9 g krist. Isofenchonsemicarbazon vom Smp. 218–221°. Nach Erwärmen mit 50 ml 30-proz. H_2SO_4 während 3 Min. auf 60° erhielt man 3,82 g Isofenchon von 99% Reinheit (gas-chromatographisch).

7. (–)-*Isofenchonchinon* (**6a**) *aus* (–)-*Isofenchon* (*vgl.* [16]). Eine Lösung von 4,61 g Isofenchon in 100 ml Eisessig wurde mit 4 g SeO_2 unter Rückfluss gekocht. Nach 48 Std. wurde abfiltriert, das Filtrat mit wässerigem KOH auf pH 4,7 gestellt, mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und der Extrakt über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Präparative Gas-Chromatographie («BECKER-Gaschromatograph»; Säule: Silicon SE 30, 3 m; Temp. 125°) des Rohprodukts ergab neben mindestens 3 nicht identifizierten Substanzen 2,34 g (–)-Isofenchonchinon vom Smp. 69–70° $[\alpha]_D^{23} = -5° \pm 1°$ ($c = 6{,}80$ in Chloroform).

8. *Mikrobiologische Reduktion von Isofenchonchinon*

8.1. *Umsetzung von* (–)-*Isofenchonchinon* (**6a**) *mit* A. orchidis. Eine Lösung von 450 mg (–)-Isofenchonchinon vom Smp. 69–70° in 5 ml Aceton wurde auf 5 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 200 ml Wasser suspendiert war. Die Kolben wurden 8 Std. auf der rotierenden Maschine bei 27° geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1), wurde die wässerige Lösung 4-mal mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Nach Trocknen des Extraktes über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne wurden 443 mg Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) neben 3 sehr schwachen, langsamer laufenden Flecken einen starken Fleck zeigte. Das Rohprodukt wurde an 50 g Kieselgel chromatographiert. Zum Eluieren diente ein Gemisch von Petroläther-Äther-(1:3). Das dem Hauptfleck entsprechende Produkt erschien zwischen 260 und 300 ml durchflossenem Elutionsgemisch. Umkristallisation aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1), ergab 408 mg reines 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7a**) [13] vom Smp. 61,5–62°; $[\alpha]_D^{23} = +98° \pm 3°$ ($c = 0{,}851$ in Chloroform); $[\alpha]_D^{23} = +57° \pm 3°$ ($c = 0{,}913$ in Äthanol).

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,59% Gef. C 71,49 H 9,60%

8.2. *Umsetzung von* (+)-*Isofenchonchinon* (**6b**) *mit* A. orchidis. Eine Lösung von 240 mg (+)-Isofenchonchinon vom Smp. 69–70° in 3 ml Aceton wurde auf 3 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 200 ml Wasser suspendiert war. Umsetzung und Extraktion erfolgt wie bei 8.1. beschrieben. Nach Umkristallisation des an Kieselgel gereinigten Rohproduktes aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) resultierten 198 mg reines krist. 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7b**) vom Smp. 61,5–62°; $[\alpha]_D^{23} = -100° \pm 3°$ ($c = 1{,}012$ in Chloroform). IR.-Spektrum identisch mit dem Spektrum von **7a**.

8.3. *CrO_3-Oxydation von 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon* (**7b**). Eine Lösung von 150 mg **7b** in 25 ml Aceton wurde unter Rühren bei 0° bis +2° langsam mit 0,6 ml einer Lösung von 3,32 g CrO_3, 2,87 ml H_2SO_4 in 50 ml Wasser (vgl. [11]) versetzt und 15 Min. weitergerührt. Nach Versetzen mit Eis, Ausschütteln mit Methylenchlorid, Waschen mit 2N H_2SO_4, 1N $NaHCO_3$ und Wasser und Abdampfen resultierten 122 mg gelbes Rohprodukt, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) gereinigt wurde. Umkristallisieren aus Pentan ergab 98 mg gelbe Kristalle, die nach IR.-Spektrum, Smp., Misch-Smp. und Dünnschichtchromatogramm mit **6a** identisch waren.

8.4. *2-endo-Acetoxy-epi-isofenchon*. 65 mg **7b** wurden mit 1,5 ml abs. Pyridin und 1,35 ml Acetanhydrid 36 Std. bei 36° stehengelassen. Hierauf wurde mit Eis versetzt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach 3-maligem Waschen mit dest. Wasser, Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne resultierten 67 mg Rohprodukt, das an 6 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel, gereinigt wurde. Es wurde ein farbloses Öl erhalten; Signale im NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: 4,9 ppm (Triplett; Methin-Proton); 2,1 ppm (Singulett; CH_3CO); 1,17 ppm (CH_3); 1,10 ppm (CH_3); 0,98 ppm (CH_3).

9. *Chemische Reduktion von (–)-Isofenchonchinon (**6a**)*

9.1. *Mit Zn in Eisessig (vgl. [13] [26])*. Eine Lösung von 150 mg (–)-Isofenchonchinon vom Smp. 69–70° in 10 ml Eisessig wurde nach der Zugabe von 1,5 ml Wasser auf 0° gekühlt und unter Rühren mit 100 mg Zn-Staub versetzt. Die anfänglich gelbe Lösung entfärbte sich im Laufe von 50 Min. Es wurde abfiltriert, mit KOH neutralisiert und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach 3-maligem Waschen mit Wasser wurde über wenig Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) war das Rohprodukt einheitlich. Auch gas-chromatographisch liessen sich die Isomeren trotz Versuchen mit verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon und Marlophen) nicht auftrennen. Nach dem NMR.-Spektrum liegt aber ein Gemisch von 65% 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7a**) und 35% 3-endo-Hydroxy-isofenchon (**9a**) vor.

9.2. *Mit $NaBH_4$*. Eine Lösung von 100 mg (–)-Isofenchonchinon vom Smp. 69–70° in 25 ml Methanol wurde bei –65° mit einer Lösung von 10 mg $NaBH_4$ in 1,5 ml Methanol versetzt. Die Reduktion und somit die Entfärbung der anfänglich gelben Lösung erfolgte innert 9–10 Min. Hierauf wurde mit 2N H_2SO_4 kongosauer gestellt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Waschen mit 2N Na_2CO_3-Lösung, Wasser und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne ergab 92 mg Rohprodukt. Nach Chromatographie an 10 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(1:3)) wurden 84 mg farbloses Öl erhalten, das nach dem NMR.-Spektrum aus 85% 7-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7a**) und 15% 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon (**8a**) bestand.

9.3. *Katalytisch mit* RANEY-*Ni*. Eine Lösung von 150 mg (–)-Isofenchonchinon in 15 ml abs. Äthanol wurde zu 150 mg vorhydriertem RANEY-Nickel gegeben und bei Normaldruck hydriert. Nach 55 Min. war die anfänglich gelbe Lösung farblos und die für die Reduktion einer Ketogruppe benötigte Menge Wasserstoff verbraucht. Nach Abfiltrieren vom Katalysator wurden zur Bildung eines azeotropen Gemisches 100 ml Methylenchlorid zugegeben und die Lösung über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Das Rohprodukt (142 mg) liess sich weder auf Dünnschichtplatten (Fliessmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) noch gas-chromatographisch an verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon und Marlophen) auftrennen. Nach dem NMR.-Spektrum liegt ein Gemisch von 30% 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7a**), 60% 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon (**8a**) und 10% 3-endo-Hydroxy-isofenchon (**9a**) vor.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] 16. Mitteilung: L. GSELL & CH. TAMM, Helv. *52*, 150 (1969).

[2] a) Vgl. A. Čapek, O. HANČ & M. TADRA, «Microbial Transformations of Steroids», Academia, Prag 1966; b) W. CHARNEY & H. L. HERZOG, «Microbial Transformations of Steroids, a Handbook», Academic Press, New York/London 1967; c) H. IIZUKA & N. NAITO, «Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids», University of Tokyo Press, Tokyo-University Park Press, State College Pennsylvania 1967.

[3] C. NEUBERG, Biochim. biophysica Acta *4*, 170 (1950).

[4] P. K. BHATTACHARYYA, B. R. PREMA, B. D. KULKARNI & S. K. PRADHAN, Nature *187*, 689 (1960).

[5] P. J. CHAPMAN, G. MEERMAN, I. C. GUNSALUS, Biochem. biophysic. Res. Commun. *20*, 104 (1965).

[6] a) W. H. BRADSHAW, H. E. CONRAD, E. J. COREY, I. C. GUNSALUS & D. LEDNICER, J. Amer. chem. Soc. *81*, 5507 (1959); b) H. E. CONRAD, J. HEDEGAARD, I. C. GUNSALUS, E. J. COREY & HISASHI UDA, Tetrahedron Letters *1965*, 561; c) P. J. CHAPMAN, G. MEERMAN, I. C. GUNSALUS, R. SRINIVASAN & K. L. RINEHART JR., J. Amer. chem. Soc. *88*, 618 (1966).

[7] H. E. CONRAD, RENÉ DU BUS, K. LIEB & I. C. GUNSALUS, «Enzymatic Keto-Lactonisation», IV Abstracts (Abstracts of the 6th International Congress of Biochemistry, New York) p. 310; JYH-FA KUO, R. PRAIRIE & I. C. GUNSALUS, *ibid.*, p. 317; P. K. BHATTACHARYYA, R. S. DHAVALIKAR & O. P. SHUKLA, *ibid.*, p. 297.

[8] M. SCHERRER-GERVAI, L. GSELL & CH. TAMM, Helv. *52*, 142 (1969).

[9] a) G. JACOB, G. OURISSON & A. RASSAT, Bull. Soc. chim. France *1959*, 1374; b) F. H. ALLEN & D. ROGERS, Chem. Commun. *1966*, 837; c) K. FREUDENBERG & LWOWSKI, Liebigs Ann. Chem. *594*, 76 (1955).

[10] W. C. EVANS, J. M. RIDGION & J. L. SIMONSEN, J. chem. Soc. *1934*, 137.

[11] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, J. chem. Soc. *1946*, 39.
[12] a) H. RUPE & F. MÜLLER, Helv. *24*, 265E (1941); b) H. RUPE & W. THOMMEN, Helv. *30*, 933 (1947).
[13] CH. COULOMBEAU, «Sur le Mécanisme de la Réduction d'α-Dicétones par le Zinc dans l'Acide Acétique». Thèse, Grenoble, 16 septembre 1965.
[14] M. KARPLUS, J. chem. Physics *33*, 316 (1960).
[15] F. L. A. ANET, Canad. J. Chemistry *39*, 786 (1961).
[16] H. P. GERVAIS & A. RASSAT, Bull. Soc. chim. France *1961*, 743.
[17] G. R. DUNCAN, J. Chromatography *8*, 37 (1962).
[18] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1967.
[19] a) L. CLAISEN & O. MANASSE, Liebigs Ann. Chem. *274*, 71 (1893); b) W. GLUND, Ber. dtsch. chem. Ges. *48*, 420 (1915).
[20] a) O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. *263*, 129 (1891); b) W. HÜCKEL, Ber. dtsch. chem. Ges. *80*, 39 (1947).
[21] O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. *275*, 103 (1893).
[22] W. HÜCKEL, H. KINDLER & H. WOLOWSKI, Ber. dtsch. chem. Ges. *77*, 220 (1944).
[23] O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. *362*, 174 (1908).
[24] L. RUZICKA & F. LIEBL, Helv. *6*, 267 (1923).
[25] O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. *269*, 326 (1892).
[26] a) A. K. RUSHENZEVA & M. DELEKTORSKAJA, C. R. Acad. Sci. USSR *29*, 41 (1940); b) A. K. RUSHENZEVA & M. DELEKTORSKAJA, J. Gen. Chemistry USSR, *10* 1653 (1940); c) S. NAMETKIN & A. RUSCHENTZEFF, J. pr. Chem. *106*, 39 (1923); d) S. NAMETKIN & A. K. RUSHENZEVA, Ž. obšč. Khim. *7*, 1343 (1937).

Mikrobiologische Umwandlung von bicyclischen Monoterpenen durch *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM.

2. Teil. Hydroxylierung von Fenchon und Isofenchon[1])

18. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

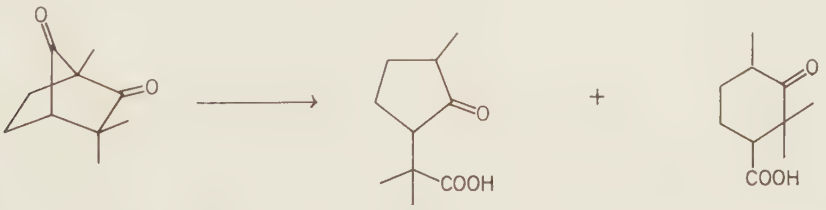
Summary. (+)-Fenchone (**3a**) was transformed to 6-exo-hydroxy-fenchone (6β-hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**1a**) and to 5-exo-hydroxy-fenchone (5β-hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-one (**4a**) by the mycelium of *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. The structure of the two products was proven by a detailed analysis of the NMR. spectra of the corresponding acetyl derivatives **2a** and **5a** respectively, and by CrO_3-oxidation. **1a** yielded the β-diketone **6a**, and **4a** the diketone **8a**. Whereas **8a** was stable to alkali **6a** was cleaved to the cyclopentane carboxylic acids **7** and **9**. – Incubation of (–)-fenchone (**3b**) yielded the enantiomeric hydroxylation products **1b** and **4b** in the same ratio. – (–)-Isofenchone (**11a**) was transformed by *Absidia orchidis* into the two epimers 6-endo-hydroxy-isofenchone (6α-hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**12a**) and 6-exo-hydroxy-isofenchone (6β-hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**10a**). CrO_3-oxidation of both **10a** and **12a** gave the same β-diketone **6a**. – (+)-Isofenchone gave the corresponding enantiomeric hydroxy derivatives **10b** and **12b** on incubation with *Absidia orchidis*.

[1]) Über einen Teil dieser Ergebnisse wurde am 151st National Meeting der American Chemical Society, Pittsburgh, Pa., USA, 22.–31. März 1966, im Rahmen des «Symposium on Novel Microbiological Transformations of Medicinal Interest» vorgetragen.

Nachdem wir bei der Inkubation der beiden α-Diketone Campherchinon und Isofenchonchinon mit einer Mycelsuspension von *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM selektive und stereospezifische Reduktion der 1,2-Dicarbonyl-Gruppierungen zu α-Ketolen festgestellt hatten, interessierte uns das Verhalten der entsprechenden Monoketone gegenüber diesem Mikroorganismus. Wie bereits in der vorstehenden Mitteilung erwähnt wurde, trat beim Campher unter analogen Bedingungen keinerlei Umwandlung ein [1]. Anders verhalten sich hingegen, wie im folgenden gezeigt wird, Fenchon (**3**) und Isofenchon (**11**).

1. Fenchon. – Bei Fenchon hatten CHAPMAN *et al.* [2] vor einigen Jahren die Bildung von 1,2-Fencholid und 2,3-Fencholid nach Inkubation mit einer *Corynebacterium*-Spezies beobachtet. Doch nahm die Reaktion nach Inkubation mit einer Mycelsuspension von *Absidia orchidis* einen anderen Verlauf, indem (+)-Fenchon (**3a**) nach Schütteln während 4 Tagen bei 28° zwei neue Produkte ergab, die beide im Dünnschichtchromatogramm langsamer liefen. Nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel erhielten wir zwei reine krist. Stoffe vom Smp. 70–70,5°; $[\alpha]_D^{24} = +49° \pm 3°$ (Chloroform) bzw. vom Smp. 84,5–85°; $[\alpha]_D^{24} = +59° \pm 3°$ (Chloroform) in einer Gesamtausbeute von ca. 50%. Die beiden Produkte sind neu. Aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften kommt dem ersteren die Struktur **1a**, dem letzteren diejenige von **4a** zu. Es handelt sich somit um Monohydroxy-Derivate des (+)-Fenchons.

Die Elementaranalyse von **1a** stimmte auf die Summenformel $C_{10}H_{16}O_2$. Das IR.-Spektrum in CCl_4-Lösung zeigte HO-Banden bei 3620 cm^{-1} (scharf) und 3480 cm^{-1} (breit), wobei letztere konzentrationsabhängig ist. Infolgedessen handelt es sich hier um eine intermolekulare Assoziation. Bei 1740 cm^{-1} war die C=O-Streckschwingung einer Carbonylgruppe sichtbar. Behandlung von **1a** mit Acetanhydrid in Pyridin bei 36° ergab das Mono-O-acetylderivat **2a**. Bei der Oxydation mit CrO_3 in Eisessig entstand das Diketon **6**. Im IR.-Spektrum von **6** waren zwei Carbonylbanden bei 1765 cm^{-1} und 1735 cm^{-1}, wie dies für β-Diketone charakteristisch ist (vgl. [3]), sichtbar. Das UV.-Spektrum in Cyclohexan zeigte Absorptionsmaxima bei 197 nm ($\log\varepsilon = 3{,}22$), 212 nm ($\log\varepsilon = 2{,}89$), 318 nm ($\log\varepsilon = 2{,}22$) und 329 nm ($\log\varepsilon = 2{,}22$). Diese Absorption ist mit dem Vorliegen von zwei isolierten Ketogruppen im Einklang. Behandlung des β-Diketons mit 1-proz. methanolischer KOH bei 48° während 3 Std. ergab ein Kristallisat, das sich nach dem NMR.-Spektrum als ein Gemisch von zwei Ketocarbonsäuren erwies. Es hat somit die für β-Dicarbonylverbindungen charakteristische Säurespaltung stattgefunden. Trotz vielen Versuchen war es nicht möglich, das Säuregemisch zu trennen. Auch die Methylester und *p*-Bromphenacylester konnten weder gas-chromatographisch noch durch Chromatographie an der Kieselgelsäule getrennt

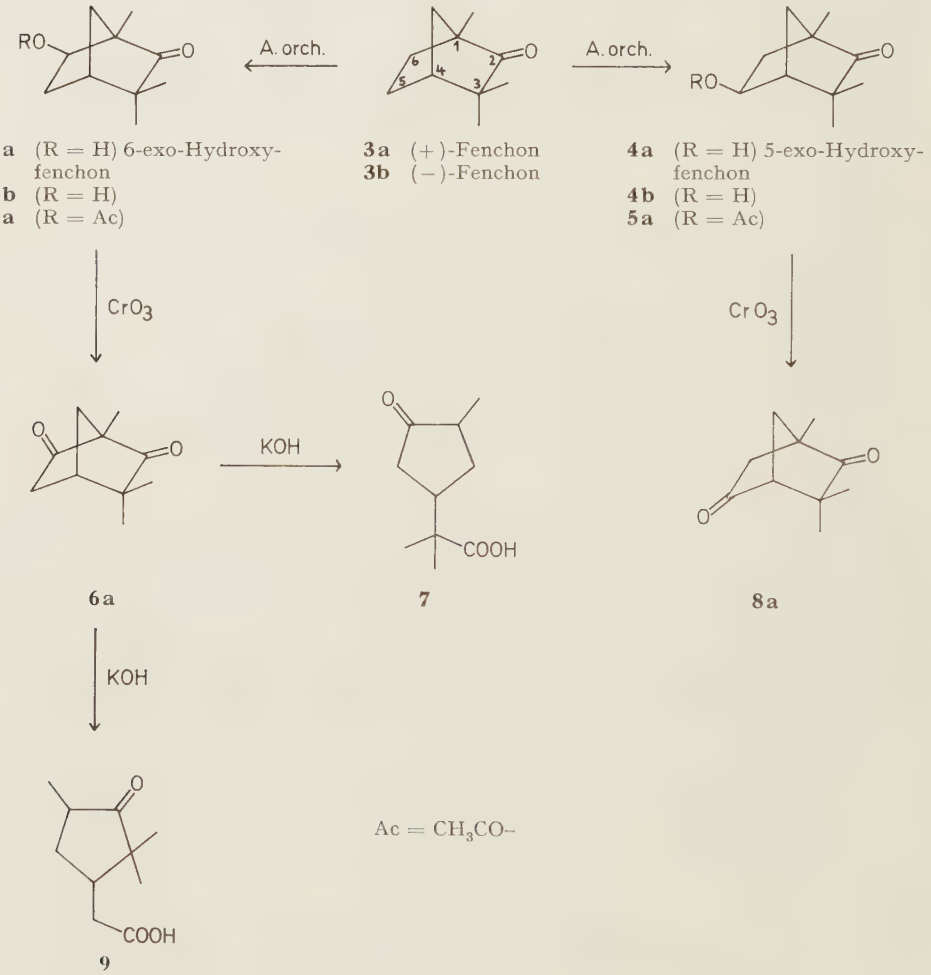


A B C

werden. Es gelang jedoch, die Konstitution der beiden unbekannten Säuren als **7** bzw. **9** mit Hilfe von spektroskopischen Methoden zu bestimmen.

Das IR.-Spektrum des Säuregemisches zeigte zwei C=O-Streckschwingungen. Die Bande bei 1740 cm^{-1} deutet auf ein Fünfringketon und diejenige bei 1710 cm^{-1} auf eine Carboxylgruppe hin. Die Säurespaltung des β-Diketons hat ausschliesslich Carbonsäuren mit einem Cyclopentanring ergeben und keine Cyclohexanoncarbonsäure. Infolgedessen müssen sich die beiden Carbonylgruppen im β-Diketon in 2,6-Stellung befinden. Die ursprünglich noch mögliche Alternative eines 6,7-Diketons A hätte bei der Säurespaltung wahrscheinlich ein Gemisch der zwei Ketocarbonsäuren B und C ergeben, von denen die eine einen Cyclohexanring besitzt.

Daraus folgt, dass die mikrobielle Hydroxylierung des (+)-Fenchons in 2-Stellung stattgefunden hat. Einen ersten Hinweis auf die Konfiguration der 2-Hydroxy-Gruppe lieferte das IR.-Spektrum. Es zeigte keine intramolekulare Assoziation mit der 6-Ketogruppe. Ein eindeutiger Konfigurationsbeweis liess sich auf Grund des 100-



1a (R = H) 6-exo-Hydroxy-fenchon
1b (R = H)
2a (R = Ac)

3a (+)-Fenchon
3b (−)-Fenchon

4a (R = H) 5-exo-Hydroxy-fenchon
4b (R = H)
5a (R = Ac)

6a **7** **8a**

9

Ac = CH_3CO–

MHz-NMR.-Spektrums des Acetylderivats **2a** erbringen, indem durch Spin-Spin-Entkopplung alle Signale zugeordnet werden konnten. Durch diese Doppelresonanzversuche waren die folgenden Kopplungen feststellbar (vgl. Fig. 1): Einstrahlung auf H_C ergab $J_{CF} = 4{,}5$ Hz und $J_{CD} = 1{,}5$ Hz sowie Einstrahlung auf H_E ergab $J_{ED} = 11{,}0$ Hz und $J_{EB} \sim 2{,}5$ Hz. Die einzelnen Protonen zeigen die folgenden Multiplizitäten:

H_A erscheint als Multiplett mit $J_{AB} = 7{,}0$ Hz; $J_{AF} = 3{,}5$ Hz und $J_{AE} = 0{,}5$ Hz. Die weitreichende Kopplung zwischen H_A und H_E beweist die endo-Stellung von H_A bzw. die exo-Stellung der 6-Acetoxygruppe. Sie verschwindet, wenn auf der Frequenz von H_E eingestrahlt wird.

H_B tritt als Multiplett auf, mit $J_{BF} = 14{,}0$ Hz; $J_{BA} = 7{,}0$ Hz; $J_{BE} = 2{,}5$ Hz und $J_{BC} = 0{,}5$ Hz. Die Kopplung zwischen H_B und H_E verschwindet, wenn auf der Frequenz von H_E eingestrahlt wird. Der Torsionswinkel zwischen H_B und H_C beträgt ca. 79° [4]. Dieser Wert entspricht nach KARPLUS [5] einer Kopplungskonstante $J < 0{,}5$ Hz. Gefunden wurden $J \simeq 0{,}5$ Hz.

H_C erscheint als unaufgelöstes Dublett mit $J_{CF} = 4{,}5$ Hz. Dieser Wert passt sehr gut auf einen Torsionswinkel von 44° (vgl. [4] [5] und die für 3-endo-Hydroxy-campher gefundenen Werte [1]). Die Kopplung J_{CE} von 1,5 Hz war nicht direkt aus dem Spektrum zu entnehmen. Wird jedoch auf H_E eingestrahlt, so wird das Signal von H_C intensiver und schärfer.

H_D verursacht ein Quadruplett, dessen linke Hälfte schlecht sichtbar ist, mit den Kopplungen $J_{DE} = 11{,}0$ Hz, welche beim Einstrahlen auf H_E verschwindet, und $J_{DC} = 1{,}5$ Hz, welche beim Einstrahlen auf H_C verschwindet.

H_E erscheint als ein unaufgelöstes Dublett, dessen rechte Hälfte schlecht sichtbar ist, mit den Kopplungen $J_{ED} = 11{,}0$ Hz (vgl. H_D); $J_{EC} = 1{,}5$ Hz (vgl. H_C) und $J_{EA} \sim 0{,}5$ Hz (vgl. H_A).

H_F gibt ein Multiplett mit den Kopplungen $J_{FB} = 14{,}0$ Hz; $J_{FA} = 3{,}5$ Hz und $J_{FC} = 4{,}5$ Hz (vgl. H_C).

Damit ist die exo-Stellung des H-Atoms an C-6 bzw. die 6-Acetoxygruppe bzw. die 6-exo-Stellung des mikrobiologisch eingeführten Hydroxyls sichergestellt. Es liegt das 6-exo-Hydroxy-fenchon vor[2]).

Das zweite Hydroxylierungsprodukt vom Smp. 84,5–85° des (+)-Fenchons besitzt, wie bereits erwähnt, die Konstitution **4a** mit der Summenformel $C_{10}H_{16}O_2$. **4a** ist somit isomer mit **1a**. Das IR.-Spektrum zeigte in CCl_4 HO-Banden bei 3625 cm^{-1} (scharf) und bei 3495 cm^{-1} (breit). Letztere verschwindet bei Änderung der Konzentration. Es handelt sich hier um eine intermolekulare Assoziation. Bei 1743 cm^{-1} war eine C=O-Schwingung sichtbar. Mit Acetanhydrid in Pyridin bei 36° lieferte **4a** das Mono-O-acetylderivat **5a**. Behandlung mit CrO_3 in Eisessig bei 22° ergab das krist. Diketon **8**, das von **6** verschieden war. Das zweite Hydroxylierungsprodukt ist somit kein Epimeres vom ersteren. Das IR.-Spektrum des Diketons in CCl_4 zeigte bei 1760 cm^{-1} nur eine einzige C=O-Streckschwingung. Nach 5-stündiger Behandlung mit methanolischer KOH bei 46° wurde **8** unverändert zurückgewonnen. Unter diesen Bedingungen war beim isomeren Diketon **6** eine vollständige Säurespaltung eingetreten. Die Stabilität gegenüber Alkali und das Auftreten einer einzigen Carbonyl-

[2]) Die an sich sehr unwahrscheinliche Möglichkeit einer nachträglichen Dehydrierung der mikrobiologisch eingeführten HO-Gruppe und Reduktion der ursprünglichen Ketogruppe ist damit ausgeschlossen.

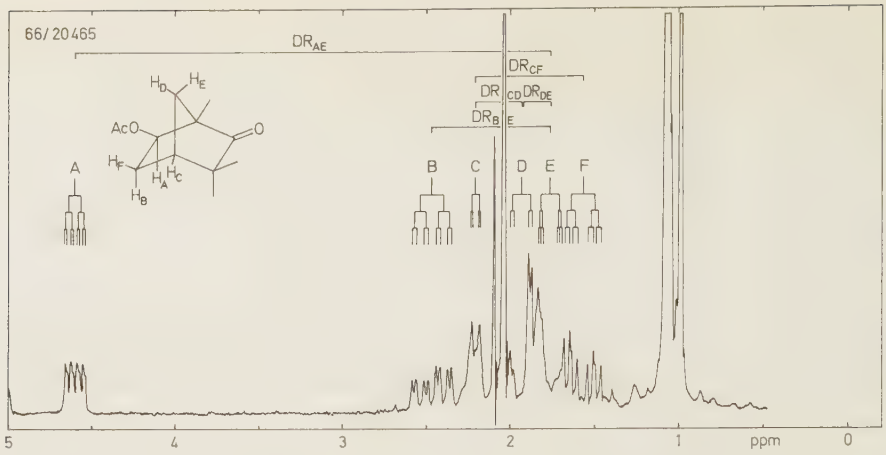


Fig. 1. *100-MHz-NMR.-Spektrum von 6-exo-Acetoxy-fenchon (6β-Acetoxy-1,3,3-trimethyl-norbornan-2-on) (**2a**) in $CDCl_3$* [3])

schwingung im IR.-Spektrum schliesst eine β-Dicarbonylgruppierung aus. Es liegt deshalb ein γ-Diketon der Struktur **8** vor. Damit ist auch die 5-Stellung der mikrobiologisch eingeführten Hydroxylgruppe festgelegt. Ihre Konfiguration liess sich auch in diesem Falle mit Hilfe des 100-MHz-NMR.-Spektrums von **4a** und Doppelresonanzversuchen eindeutig bestimmen (vgl. Fig. 2). Dadurch liess sich die folgende Zuordnung treffen:

Einstrahlung auf H_A ergab $J_{AD} = 6{,}5$ Hz; $J_{AF} = 1{,}7$ Hz; $J_{AC} = 1{,}0$ Hz und $J_{AE} = 1{,}0$ Hz sowie Einstrahlung auf H_B ergab $J_{CF} = 1{,}5$ Hz und $J_{CE} = 1{,}0$ Hz und schliesslich wurden durch Einstrahlung auf H_C die Kopplungen $J_{BC} = 2{,}0$ Hz; $J_{CF} = 1{,}5$ Hz; $J_{CA} = 1{,}0$ Hz und $J_{CE} = 1{,}0$ Hz ermittelt. Die Signale der einzelnen Protonen zeigten die folgenden Aufspaltungen:

H_A erscheint als unaufgelöstes Dublett mit $J_{AD} = 6{,}5$ Hz; $J_{AF} = 1{,}7$ Hz und $J_{AC} = 1{,}0$ Hz. Die Aufspaltungen verschwinden bei Entkopplung von H_A. Bei der letzteren handelt es sich um eine weitreichende Kopplung, die nur mit der endo-Stellung von H_A bzw. der exo-Stellung der HO-Gruppe vereinbar ist.

H_B tritt als Quadruplett auf mit $J_{BE} = 10{,}5$ Hz und $J_{BC} = 2{,}0$ Hz. Diese Aufspaltung verschwindet bei Entkopplung von H_C.

H_C erscheint als unaufgelöstes Singulett. Es lassen sich aber folgende Kopplungen nachweisen: $J_{CA} = 1{,}0$ Hz nach Entkopplung von H_A; $J_{CB} = 1{,}0$ Hz, indem Entkopplung von H_B eine schwache Aufspaltung des H_C-Signals bewirkt; $J_{CF} = 1{,}0$ Hz, die nicht eindeutig ist, sowie $J_{CF} = 1{,}5$ Hz.

H_D verursacht ein Multiplett mit $J_{DF} = 13{,}5$ Hz, $J_{DA} = 6{,}5$ Hz, das bei Entkopplung von H_A verschwindet, sowie $J_{DE} = 2{,}2$ Hz.

[3]) Aufgenommen mit einem VARIAN-Spektrometer HA-100; Feldänderungsgeschwindigkeit 1 Hz/s; chemische Verschiebungen in δ-Werten mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard (δ = 0). DR. bedeutet Doppelresonanz. Den Herren PD Dr. R. F. ZÜRCHER und Dr. F. STUBER, CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, sei auch an dieser Stelle für diese Messungen bestens gedankt.

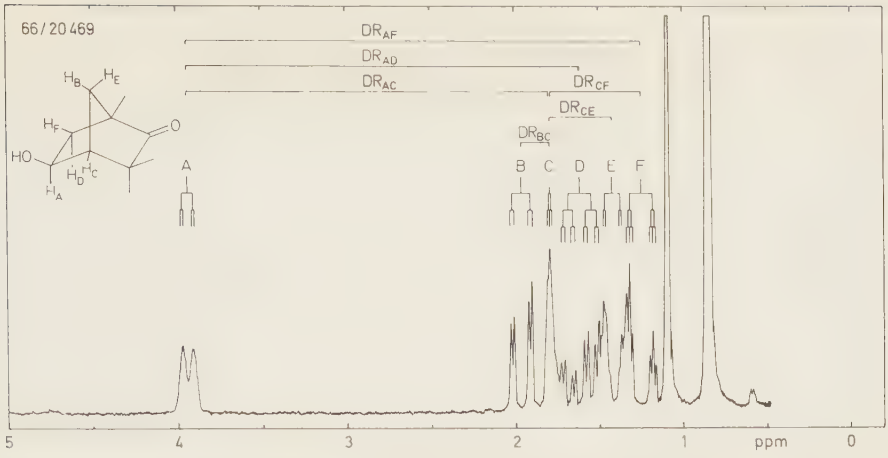


Fig. 2. *100-MHz-NMR.-Spektrum von 5-exo-Hydroxy-fenchon (5β-Hydroxy-1,3,3-trimethyl-norbornan-2-on) (**4a**) in $C_6D_6 + D_2O$*[3])

H_E erscheint als Multiplett, dessen linke Seite nicht aufgelöst ist, mit J_{EB} = 10,5 Hz; die bei Einstrahlung auf H_B verschwindet; J_{EC} = 1,0 Hz, welche nicht eindeutig nachweisbar ist, doch verändert sich das Signal bei Einstrahlung auf H_C; J_{EA} = 1,0 Hz, die sich bei Einstrahlung auf H_A verändert, sowie J_{ED} = 2,2 Hz. Diese Kopplung ist aus der Aufspaltung von H_D ersichtlich.

H_F tritt als Sextett in Erscheinung. Seine linke Seite wird teilweise durch das Signal von H_E verdeckt. Folgende Kopplungen liessen sich feststellen: J_{FD} = 13,5 Hz; J_{FA} = 1,5 Hz und J_{FC} = 1,5 Hz. Letztere verschwindet bei Einstrahlung auf H_C.

Damit ist die 5-exo-Stellung der mikrobiologisch eingeführten HO-Gruppe sichergestellt[2]).

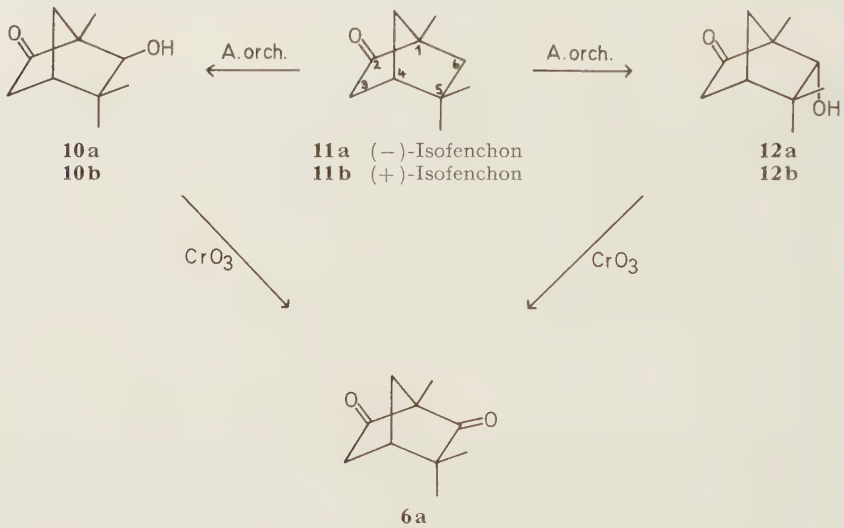
Um die Stereospezifität der mikrobiellen Hydroxylierung näher abzuklären, inkubierten wir das enantiomere (–)-Fenchon (**3b**) mit einer wässerigen Mycelr suspension von *Absidia orchidis* unter den gleichen Bedingungen. Wir erhielten zwadie beiden gleichen, enantiomeren Hydroxylprodukte **1b** und **4b**, jedoch in verschiedenem Mengenverhältnis, nämlich ca. 60% von **1b** und ca. 30% von **4b**.

2. Isofenchon. – (–)-Isofenchon (**11a**) ergab nach Inkubation mit einer wässerigen Mycelsuspension von *A. orchidis* während 3,5 Tagen zwei neue Reaktionsprodukte (Ausbeute ca. 60%), die im Dünnschichtchromatogramm langsamer liefen. Das Dünnschichtchromatogramm des Rohprodukts zeigte noch 6 weitere, allerdings bedeutend schwächere Flecke, die aber aus der Nährlösung stammten und deshalb nicht weiter untersucht wurden. Nach dreimaliger Chromatographie des Rohprodukts an Kieselgel erhielten wir zu etwa gleichen Teilen zwei ölige Produkte, die nach längerem Stehen erstarrten, sich aber nicht umkristallisieren liessen. Das bei 63 64,5° schmelzende Produkt besitzt die Konstitution **10**, dasjenige vom Smp. 70-71° Struktur **12**. Die Analysenwerte beider Stoffe passten auf die Formel $C_{10}H_{16}O_2$ eines Monohydroxyderivats von **11**. Das IR.-Spektrum von **10** in CCl_4-Lösung zeigte Hydroxyl-

banden bei 3610 cm^{-1} (scharf) und 3460 cm^{-1} (breit). Letztere verschwand nach Verdünnen der Lösung. Sie dürfte durch intramolekulare Assoziation zustande kommen.

Das IR.-Spektrum von **12** in CCl_4-Lösung zeigte bei 3605 cm^{-1} nur eine schwache Hydroxylbande, hingegen bei 3460 cm^{-1} eine sehr breite Schwingung, die nach Verdünnung erhalten blieb. Es dürfte sich hier um eine intermolekulare Assoziation handeln.

Sowohl **10** als auch **12** ergaben bei der Oxydation mit CrO_3 in Eisessig dasselbe krist. Diketon, das nach allen Kriterien mit dem β-Diketon **6a** identisch war. Es liegt ein Epimerenpaar vor. Das Diketon **6a** war durch Oxydation des Hydroxylierungsproduktes **1a** des (+)-Fenchons (**3a**) erhalten worden (siehe 1.). Damit ist die 6-Stellung der Hydroxylgruppe in **10** und **12** gesichert. Anhaltspunkte über die Konfiguration der Hydroxylgruppen von **10** und **12** ergeben die IR.-Spektren, indem die intramolekulare Assoziation von **12** mit der 2-Ketogruppe auf eine endo-ständige Stellung deutet. Die Zuordnung liess sich mit Hilfe des 100-MHz-NMR.-Spektrums von **10** und **12** und Doppelresonanzversuchen beweisen (vgl. Fig. 3).



10a
10b

11a (–)-Isofenchon
11b (+)-Isofenchon

12a
12b

6a

Aus den DREIDING-Modellen der beiden Verbindungen ist ersichtlich, dass bei **12a** eine weitreichende Kopplung (W-Struktur) zwischen dem exo-ständigen Proton H_A und H_B möglich ist. Eine Kopplung zwischen H_A und H_D ist jedoch nicht zu erwarten. Bei **10a** ist hingegen eine weitreichende Kopplung zwischen den H_A und H_B kaum möglich, hingegen scheint eine solche zwischen H_A und H_D wahrscheinlich. Um dies abzuklären, mussten zuerst die Signale von H_A, H_B und H_D im Spektrum lokalisiert werden.

Das NMR.-Spektrum von **12a** (vgl. Fig. 3) zeigt bei 3,56 ppm ein schwach verbreitertes Singulett, das dem Methinproton H_A zugeordnet werden kann. Bei 1,52 ppm und 1,41 ppm erscheint ein Dublett, dessen Kopplungskonstante von 11 Hz die Vermutung nahe legt, dass es sich hier um H_C oder H_D handelt. Proton *B* muss sich im Signalhaufen zwischen 2,5 ppm und 1,8 ppm befinden. Beim Einstrahlen mit der

Frequenz von 2710 Hz trat eine Verschärfung der Signale bei 3,56 ppm (H_A) und 1,52 ppm bzw. 1,41 ppm (Dublett von H_C oder H_D) ein. Damit kann das Signal bei 2,1 ppm H_B zugeordnet werden. Gleichzeitig ist die weitreichende Kopplung zwischen H_A und H_B bewiesen. Diese ist aber nur möglich, wenn H_A exoständig angeordnet ist. Die Hydroxylgruppe nimmt somit die endo-Stellung ein.

Das 100-MHz-Spektrum von **10a** (vgl. Fig. 4) zeigt bei 3,10 ppm ein verbreitertes Singulett, das H_A zugeordnet werden kann. Zwischen 1,8 ppm und 1,4 ppm ist ein Signalhaufen von 3–4 Protonen sichtbar. Bei 1,49 ppm und 1,38 ppm erscheint wieder eines der beiden Protonen H_C bzw. H_D als Dublett mit $J \simeq 11$ Hz. Wird auf H_A eingestrahlt, so wird das Dublett schärfer, d.h. die Kopplung von H_A ist verschwunden. Folglich handelt es sich hier um H_D, das mit H_C, welches sich im Signalhaufen be-

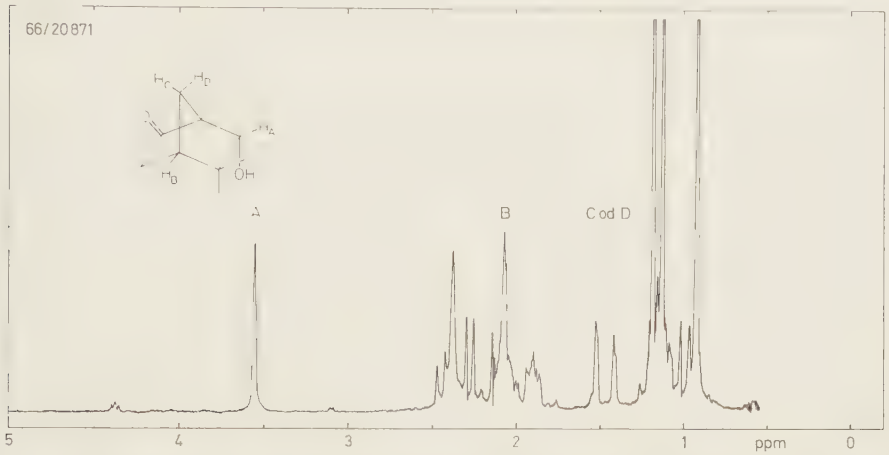


Fig. 3. *100-MHz-NMR.-Spektrum von 6-endo-Hydroxy-isofenchon (6α-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**12a**) in $CDCl_3 + D_2O$*[3])

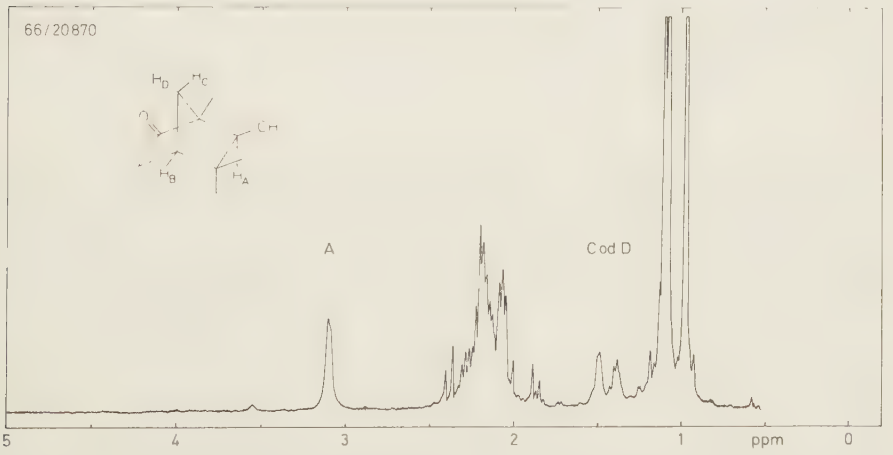


Fig. 4. *100-MHz-NMR.-Spektrum von 6-exo-Hydroxy-isofenchon (6β-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**10a**) in $CDCl_3 + D_2O$*[3])

findet, koppelt ($J \simeq 11$ Hz). Beim Einstrahlen auf H_D verschwindet die Kopplung von 1,5 Hz, mit der H_A durch H_D aufgespalten wird. Gleichzeitig vereinfacht sich der Signalhaufen in der Gegend von 2,2 ppm, wo sich H_C befinden dürfte. Damit ist die endo-Stellung von H_A bzw. die exo-Konfiguration der HO-Gruppe sichergestellt.

Umsetzung des enantiomeren (+)-Isofenchons (**11b**) mit *A. orchidis* unter analogen Bedingungen ergab die beiden optischen Antipoden der oben beschriebenen Hydroxylierungsprodukte, also **10b** und **12b** in genau gleicher Ausbeute und gleichem Mengenverhältnis.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (Projekte Nr. 2535 und 3976).

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze ca. ± 2°. Substanzproben zur Messung der spez. Drehungen und Spektren wurden 20 Min. bei 35°/15 Torr und zur Elementaranalyse 1 Std. bei 25°/0,02 Torr getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (E. THOMMEN). Die IR.-Spektren wurden entweder mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, oder mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell IR 8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, im Spektrallaboratorium unseres Instituts (K. AEGERTER) aufgenommen. Zur Säulenchromatographie nach DUNCAN [6] diente Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) [7] wurde Kieselgel G als Adsorbens verwendet. Als Fliessmittel dienten meistens Äther-Petroläther-Gemische. Die Flecke wurden durch Besprühen mit H_2SO_4 in Äthanol und anschliessendem Erwärmen auf 110° oder durch J_2-Dämpfe sichtbar gemacht.

2. Kultur der Mikroorganismen. Proben einer Schrägagarkultur von *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM (Herkunft: Dr. Y. NOZAKI, SHIONOGI & Co., LTD., Osaka, Japan) wurden direkt als Impfmaterial für die Nährlösung verwendet. Nährlösung: 3,5% Glucose, 3,0% Bacto-Pepton, 0,5% Maislauge. Zum Versuch wurden 1000-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml Nährlösung benutzt. Die Gefässe wurden 40 Min. im Dampfautoklaven bei 120° sterilisiert und dann beimpft. Die ERLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) 48 Std. bei 27° inkubiert. Nach Zugabe des Substrats (50–90 mg pro ERLENMEYER-Kolben) wurde während 72–120 Std. weitergeschüttelt. Bei der Umsetzung in Mycelsuspension wurde das Mycel zuerst mit dem umzusetzenden Substrat aktiviert (25 mg Substrat in 0,5 ml Aceton pro ERLENMEYER-Kolben). Nach weiterem Schütteln während 12 Std. wurde das Mycel durch Filtration auf einem Gazestoff gesammelt, leicht ausgepresst, mit dest. Wasser gewaschen und wiederum auf die ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml dest. Wasser verteilt. Zu dieser Mycelsuspension wurde das Substrat, gelöst in wenig Methanol oder Aceton, gegeben.

3. Hydroxylierung von (+)- und (−)-Fenchon

*3.1. Umsetzung von (+)-Fenchon (**3a**) mit* A. orchidis. Eine Lösung von 2,13 g (+)-Fenchon in 15 ml Methanol wurde auf 30 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, die das Pilzmycel in je 150 ml Nährlösung suspendiert enthielten, das 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Die Umsetzung wurde bei 28° durchgeführt und anhand der Dünnschichtchromatographie von entnommenen Proben verfolgt. Nach 96 Std. wurde das Mycel abfiltriert, mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) nachgewaschen und die wässerige Lösung 4mal mit je 350 ml Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Die dabei entstandene Emulsion trennte sich beim langsamen Filtrieren durch gewöhnliche Watte. Nach Waschen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne, wurden 1,73 g braunes Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm neben Edukt zwei langsamer laufende Flecke erkennen liess. Beim Besprühen mit H_2SO_4 und anschliessendem Erwärmen auf 95° färbten sich diese zwei Flecke violett. Sechs weitere schwache Flecke waren sichtbar. Es wurde aber auf eine Isolation dieser Substanzen verzichtet, da das Dünnschichtchromatogramm eines Extraktes einer ohne Substrat unter gleichen Bedingungen gewachsenen Kultur von *A. orchidis* ebenfalls diese Flecke zeigte. Das Rohprodukt

wurde an 220 g Kieselgel chromatographiert (Elutionsgemisch: Äther-Petroläther-(4:1)). Erhalten wurden die folgenden Fraktionen (Reihenfolge der Elution): 492 mg (+)-Fenchon (**3a**), 87 mg Material aus drei kleinen Fraktionen (verworfen), 90 mg 6-exo-Hydroxy-fenchon (**1a**), 285 mg Gemisch von **1a** und **3a** und 128 mg 5-exo-Hydroxy-fenchon (**3a**). Durch nochmalige Chromatographie des Gemisches von **1a** und **3a** (285 mg) an 100 g Kieselgel (Elutionsgemisch: Äther-Petroläther-(2:1)) wurden neben 78 mg Gemisch von **1a** und **3a** 45 mg reines **1a** und 72 mg reines **3a** erhalten. Kristallisieren der **1a**-haltigen Fraktionen aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) ergab 122 mg *6-exo-Hydroxy-fenchon* (*6β-Hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (***1a***) in farblosen Kristallen vom Smp. 70–70,5°; $[\alpha]_D^{24} = +49° \pm 3°$ (c = 1,457 in Chloroform); UV.-Spektrum in Cyclohexan: Maxima bei 195 (3,23); 292 (1,45); 309 (1,41) nm ($\log\varepsilon$).

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,95% Gef. C 72,26 H 10,22%

Kristallisation der **4a**-haltigen Fraktionen aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) ergab 189 mg *5-exo-Hydroxy-fenchon* (*5β-Hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (***4a***) in farblosen Nadeln vom Smp. 84,5–85°; $[\alpha]_D^{24} = +59° \pm 3°$ (c = 1,309 in Chloroform); UV.-Spektrum in Cyclohexan: Maxima bei 192 (3,04); 275 (1,61); 280 (1,61); 288 (1,61); 304 (1,56) nm ($\log\varepsilon$).

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,59% Gef. C 71,59 H 9,60%

3.2. 6-exo-Acetoxy-fenchon (*6β-Acetoxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (***2a***). Eine Lösung von 58 mg 6-exo-Hydroxy-fenchon (**1a**) in 1,5 ml abs. Pyridin und 1,35 ml Acetanhydrid wurde bei 36° stehengelassen. Nach 40 Std. wurde mit Eis versetzt, mit HCl kongosauer gestellt und 4mal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach 3maligem Waschen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne resultierten 57 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 6 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel gereinigt wurde. Es resultierten 45 mg farbloses Öl; $[\alpha]_D^{22} = +16° \pm 3°$ (c = 0,813 in Chloroform).

3.3. 5-exo-Acetoxy-fenchon (*5β-Acetoxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (***5a***). Eine Lösung von 70 mg 5-exo-Hydroxy-fenchon (**4a**) ergab nach der wie bei 3.2. durchgeführten Acetylierung 72 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 10 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel, gereinigt wurde. Es resultierte ein farbloses Öl, das nach längerem Stehen bei –8° Kristalle vom Smp. 27–28° ergab; $[\alpha]_D^{22} = +19° \pm 3°$ (c = 1,025 in Chloroform). Signale im NMR.-Spektrum in Deuterochloroform: 5,18 ppm (Dublett von H an C-3; J = 5,4 Hz); 2,05 ppm Singulett (CH_3CO–); 1,15–1,05 ppm (3 CH_3–).

3.4. 1,3,3-Trimethyl-nor-bornan-2,6-dion (***6a***) *aus* ***1a***. Eine Lösung von 180 mg 6-exo-Hydroxy-fenchon (**1a**) in 10 ml Eisessig wurde mit 10 ml 4-proz. CrO_3-Lösung (4 g CrO_3 in 100 ml Eisessig + 2 ml H_2O) bei 22° versetzt. Nach 4 Std. Rühren wurde die Lösung mit der doppelten Menge Wasser versetzt, mit 50-proz. KOH neutralisiert und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 2N H_2SO_4, 10-proz. $KHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Das an 20 g Kieselgel chromatographierte Rohprodukt (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(3:2)) ergab nach Umkristallisieren aus Pentan 146 mg farblose Kristalle vom Smp. 27–28°; $[\alpha]_D^{24} = +29° \pm 3°$ (c = 1,792 in Chloroform). IR.- und UV.-Spektrum vgl. theoret. Teil.

$C_{10}H_{14}O_2$ (166,21) Ber. C 72,26 H 8,49% Gef. C 72,01 H 8,51%

3.5. 1,5,5-Trimethyl-nor-bornan-2,5-dion (***8a***) *aus* ***4a***. Eine Lösung von 200 mg 5-exo-Hydroxy-fenchon (**4a**) in 10 ml Eisessig wurde mit 10 ml 4-proz. CrO_3-Lösung versetzt und 16 Std. bei 22° stehengelassen. Die wie bei 3.5. beschriebene Aufarbeitung ergab nach chromatographischer Reinigung an 15 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel und Kristallisation aus Pentan 162 mg farblose Nadeln vom Smp. 44–45°; $[\alpha]_D^{24} = +80° \pm 3°$ (c = 1,055 in Chloroform). IR.-Spektrum vgl. theoret. Teil.

$C_{10}H_{14}O_2$ (166,21) Ber. C 72,26 H 8,49% Gef. C 72,18 H 8,47%

3.6. Spaltung von 1,3,3-Trimethyl-nor-bornan-2,6-dion (***6a***) *mit KOH*. Eine Lösung von 62 mg **6a** in 1-proz. methanolischer KOH wurde 3 Std. bei 48° stehengelassen. Ausschütteln mit Methylenchlorid ergab keinen Eindampfrückstand. Hierauf wurde die Reaktionslösung mit verd. H_2SO_4 kongosauer gestellt und erneut mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Das saure Rohprodukt (58 mg) lieferte aus Pentan-Methylenchlorid-(4:1) 43 mg Kristallisat vom Smp.

75–80°, bestehend aus den Cyclopentancarbonsäuren **7** und **9**. Das Säuregemisch liess sich weder durch Umkristallisieren noch durch Dünnschichtplattenchromatographie (Fliessmittel: Äther-Eisessig-(99:1)) zerlegen. Eine Probe von 28 mg wurde in 3 ml abs. Äther gelöst und bei 22° mit einem Überschuss einer frisch bereiteten Lösung von Diazomethan in Äther versetzt. Nach 5 Min. wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand nochmals analog mit ätherischem Diazomethan behandelt. Nach Eindampfen resultierten 22 mg farblose Flüssigkeit. Im Dünnschichtchromatogramm in zwei Fliessmitteln (Methanol-Methylenchlorid-(1:99) und Äther-Petroläther-(5:3)) liessen sich die beiden erhaltenen isomeren Methylester nicht trennen. Gas-chromatographische Trennversuche an verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon, Marlophen und Neopentylglycol-succinat-H_3PO_4) waren ebenfalls erfolglos.

*3.7. Reinigung von (−)-Fenchon (**3b**) über das Semicarbazon (vgl.* [8]). Eine Lösung von 10 g rohem (−)-Fenchon (Präparat der FLUKA AG., Buchs SG; enthält nach dem Gas-Chromatogramm weitere nicht identifizierte Stoffe, die weder mit Campher noch mit Isofenchon identisch sind) in 50 ml Äthanol wurde mit 10 g Semicarbazid-hydrochlorid und 10 g Na-Acetat in 20 ml Wasser versetzt und vier Tage bei 22° gerührt. Darauf wurde die Lösung vier Wochen bei 22° stehengelassen. Das noch klare Reaktionsprodukt wurde zu 200 ml Wasser gegeben, wobei sich ein Niederschlag bildete, und mit Wasserdampf destilliert. Dadurch liessen sich unverändertes Fenchon und weitere wasserdampfflüchtige Terpene abscheiden. Das nicht wasserdampfflüchtige, rohe Fenchonsemicarbazon ergab nach 3maliger Umkristallisation aus Äthanol-Wasser 3,18 g Nadeln vom Smp. 181–182°. 3,10 g dieser Kristalle wurden in 75 ml H_2SO_4–H_2O-(1:2) unter Rühren bei 50° gelöst, und nach 3,5 Min. mit der doppelten Menge Eiswasser versetzt und schliesslich mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 10-proz. $KHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Es resultierten 1,76 g (−)-Fenchon (**3b**); $[\alpha]_D^{24} = -71° \pm 2°$ (c = 2,52 in Äthanol). Nach Gas-Chromatographie war das Präparat mindestens zu 99% rein.

*3.8. Umsetzung von (−)-Fenchon (**3b**) mit* A. orchidis. 8,5 ml einer Lösung von 1,22 g (−)-Fenchon in Methanol wurden auf 17 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben gleichmässig verteilt, welche das Pilzmycel von *A. orchidis* in je 150 ml Nährlösung enthielten, das während 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Der nach den Angaben von 3.1. erhaltene Rohextrakt (752 mg) wurde zweimal an je 100 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) chromatographiert. Aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) resultierten 79 mg *6-exo-Hydroxy-fenchon (6β-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on)* (**1b**) vom Smp. 70–70,5°; $[\alpha]_D^{24} = -47° \pm 3°$ (c = 1,983 in Chloroform); sowie 59 mg *5-exo-Hydroxy-fenchon (3β-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on)* (**4b**) vom Smp. 84,5–85°; $[\alpha]_D^{24} = -60° \pm 3°$ (c = 1,491 in Chloroform). Das IR.-Spektrum von **1b** ist identisch mit demjenigen von **1a**, das IR.-Spektrum von **4b** mit demjenigen von **4a**.

4. Hydroxylierung von (+)- und (−)-Isofenchon

*4.1. Umsetzung von (−)-Isofenchon (**11a**) mit* A. orchidis. 12 ml einer Lösung von 1,48 g (−)-Isofenchon in Methanol wurden auf 24 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, die Mycel von *A. orchidis* in je 150 ml Nährlösung enthielten, das während 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Die Umsetzung wurde bei 28° während 84 Std. durchgeführt und anhand der Dünnschichtchromatographie von entnommenen Proben verfolgt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) wurde die wässerige Lösung 4mal mit je 300 ml Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Die dabei entstandene Emulsion trennte sich beim langsamen Filtrieren durch Watte. Nach Waschen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne wurden 695 mg Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm neben Edukt zwei langsamer laufende Flecke erkennen liess. Weitere sechs schwache Flecke waren sichtbar, die nicht isoliert wurden (vgl. 3.1.). Nach dreimaliger Chromatographie des Rohprodukts (784 mg) an 225 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) waren beide Flecke getrennt und weitgehend gereinigt. Sie fielen als Öle an, die nach einiger Zeit zu einer Kristallmasse erstarrten. Umkristallisieren gelang nicht. Erhalten wurden:

1) 115 mg *6-exo-Hydroxy-isofenchon (6β-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on)* (**10a**) vom Smp. 63–64,5°; $[\alpha]_D^{23} = -28° \pm 3°$ (c = 2,670 in Chloroform). NMR.- und IR.-Spektren vgl. theoret. Teil.

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,59% Gef. C 71,21 H 9,93%

2) 131 mg *6-endo-Hydroxy-isofenchon* (*6α-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (***12a***) vom Smp. 70–71,5°; $[\alpha]_D^{23} = -18° \pm 3°$ (*c* = 5,025 in Chloroform). NMR.- und IR.-Spektren vgl. theoret. Teil.

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,95% Gef. C 71,27 H 9,86%

4.2. 1,3,3-Trimethyl-nor-bornan-2,6-dion (***6a***) *aus* ***10a*** *bzw.* ***12a***. Eine Lösung von 45 mg 6-endo-Hydroxy-isofenchon (**10a**) in 5 ml Eisessig wurde bei 22° mit 5 ml 4-proz. CrO_3-Lösung (4 g CrO_3 in 100 ml Eisessig + 2 ml H_2O) versetzt. Nach 4 Std. wurde die Lösung mit der 3fachen Menge Wasser versetzt, mit 50-proz. KOH neutralisiert und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 2N H_2SO_4, 10-proz. $KHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Das an 5 g Kieselgel chromatographierte Rohprodukt (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(3:2)) ergab nach dem Umkristallisieren aus Pentan 35 mg farblose Kristalle vom Smp. 27–28°; $[\alpha]_D^{24} = +32° \pm 3°$ (*c* = 1,568 in Chloroform); Misch-Smp. mit **6a** aus **1a** (s. 3.4.) ohne Depression. Die IR.-Spektren waren identisch. – Die analoge Reaktion mit 45 mg 6-exo-Hydroxy-isofenchon (**12a**) ergab 32 mg krist. **6a**.

4.3. Umsetzung von (+)-Isofenchon (***11b***) *mit* A. orchidis. 5 ml einer Lösung von 730 mg (+)-Isofenchon in Methanol wurden auf 10 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, die Mycel von *A. orchidis* in je 150 ml Nährlösung enthielten, das während 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Bei der Umsetzung und Isolierung wurde wie bei 4.1. beschrieben verfahren. Nach 3maliger Chromatographie des Rohproduktes (378 mg) an 100 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) konnten die zwei Hydroxylierungsprodukte **10b** und **12b** getrennt und weitgehend gereinigt werden. Sie fielen als Öle an, die nach einiger Zeit zu einer Kristallmasse erstarrten, sich aber nicht umkristallisieren liessen. Erhalten wurden: 1) 61 mg *6-exo-Hydroxy-isofenchon* (*6β-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (***10b***) vom Smp. 63–64,5°; $[\alpha]_D^{23} = +25° \pm 3°$ (*c* = 2,132 in Chloroform). Das IR.-Spektrum war mit demjenigen von **10a** identisch; 2) 64 mg *6-endo-Hydroxy-isofenchon* (*6α-Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (***12b***) vom Smp. 70–71,5°; $[\alpha]_D^{23} = +20° \pm 3°$ (*c* = 2,013 in Chloroform). Das IR.-Spektrum war mit demjenigen von **12a** identisch.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] 17. Mitteilung: B. PFRUNDER & CH. TAMM, Helv. *52*, 1630 (1969).

[2] P. J. CHAPMAN, G. MEERMAN, I. C. GUNSALUS, Biochem. biophysic. Res. Commun. *20*, 104 (1965).

[3] CH. TAMM & R. ALBRECHT, Helv. *43*, 768 (1960); H. MÜHLE & CH. TAMM, Helv. *46*, 268 (1963).

[4] F. L. A. ANET, Canad. J. Chemistry *39*, 786 (1961).

[5] M. KARPLUS, J. chem. Physics *33*, 316 (1960).

[6] G. R. DUNCAN, J. Chromatography *8*, 37 (1962).

[7] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen und Heidelberg 1967.

[8] O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. *269*, 326 (1892).

Curriculum vitae

Am 3. Juni 1939 wurde ich, BEAT Viktor Ernst Rudolf PFRUNDER, Bürger von Basel, als Sohn des Viktor Rudolf Pfrunder, Physiko-Chemiker, und der Jrène Sally geb. Martz, in Basel geboren.

Dort besuchte ich von 1947–1951 die Primarschule. Im Frühjahr 1959 bestand ich die Matura an der Freien Evangelischen Schule in Basel.

Im Sommersemester 1959 immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel und begann mein Chemiestudium. Nach den beiden Vordiplomprüfungen (Frühjahr 1960 und Herbst 1962; Hauptfächer: Mathematik und Physik; Nebenfächer: Zoologie und Pharmakologie) erwarb ich im Frühjahr 1964 das Chemikerdiplom.

Im Sommersemester 1964 begann ich meine Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Ch. Tamm.

Während meiner Studienzeit habe ich insgesamt 597 Tage Militärdienst geleistet.

Meine Ausbildung verdanke ich folgenden Herren Professoren und Dozenten: E. Baumgartner, E. Bonjour, M. Brenner, K. Bucher, P. Buchner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, S. Fallab, J. Gantner, C. Grob, P. Huber, W. Kuhn, H. Labhart, A. Marxer, E. Miescher, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, P. Scherrer, P. Schiess, H. Seiler, Ch. Tamm, M. Türkauf und R. Wizinger.